



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

**Caracterização preliminar de vírus de carraças tendo por
base a amplificação dirigida *versus* amplificação não-
dirigida de sequências genómicas virais**

Lúcia Maria Alves Figueira

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS
BIOMÉDICAS ESPECIALIDADE EM BIOLOGIA MOLECULAR EM SAÚDE
TROPICAL E INTERNACIONAL**

Outubro de 2016



Universidade Nova de Lisboa

Instituto de Higiene e Medicina Tropical

***Caracterização preliminar de vírus de carraças tendo por base a
amplificação dirigida versus amplificação não-dirigida de sequências
genómicas virais***

Autor: Lúcia Maria Alves Figueira

Orientador: Professor Doutor Ricardo Parreira

Coorientador: Professora Doutora Carla Maia

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Ciências Biomédicas

A presente dissertação foi redigida de acordo com o novo acordo ortográfico

Elementos Bibliográficos resultantes da Dissertação

Elementos Bibliográficos resultantes da Dissertação

(Ver Anexo VII)

André Pereira, Lúcia Figueira, Mónica Nunes, Aida Esteves, António José Cotão, Maria Luísa Vieira, Carla Maia, Lenea Campino, Ricardo Parreira. Multiple phlebovirus (*Bunyaviridae*) genetic groups detected in *Rhipicephalus*, *Hyalomma* and *Dermacentor* ticks from southern Portugal. *Ticks and Tick-borne Diseases*. 2016. Artigo aceite para publicação.

Dedicatória

Dedicatória

Dedico esta tese aos meus pais

Agradecimentos

Não poderia deixar de expressar os meus sinceros agradecimentos a todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a concretização desta etapa da minha formação académica:

Ao Professor Doutor Ricardo Parreira, orientador desta dissertação, o meu profundo agradecimento pela orientação e disponibilidade que sempre revelou, pelas críticas e sugestões, pela confiança que depositou em mim, pela motivação e pelos conhecimentos transmitidos que contribuíram para o meu enriquecimento pessoal, académico e científico.

À Professora Doutora Carla Maia, pela co-orientação, disponibilidade e atenção demonstrada, pelos esclarecimentos e sugestões de inestimável importância para a prossecução deste trabalho.

À Professora Doutora Aida Esteves pela ajuda imprescindível no isolamento em cultura, pelo apoio e simpatia demonstrada, pela disponibilidade e receptividade, estando sempre pronta a aconselhar-me, sensatamente, em todas as ocasiões.

Ao Professor Doutor João Piedade, pelos conselhos e boa disposição.

À Mestre Mónica Nunes por gentilmente ter cedido as carraças utilizadas no decurso deste trabalho, prestando uma contribuição fundamental para que este estudo fosse possível, pela ajuda e disponibilidade que sempre revelou.

À Ângela Lopes pelo apoio imprescindível no laboratório, pela disponibilidade e amabilidade sempre presentes, pelos conselhos, amizade e boa disposição em todos os momentos.

Ao André Pereira pela colaboração e apoio no decurso deste trabalho.

Agradecimentos

Aos meus colegas de laboratório, em especial à Mariana pela amizade, companheirismo, pela partilha de bons momentos e entreajuda.

Aos colegas de mestrado, e acima de tudo amigos, Cátia, Valete, Yulia, Joana, Francisca, Marisa, Patrícia e Filipa pelos bons momentos partilhados.

À minha prima Nicole pela disponibilidade e apoio prestado.

Ao Zé Eduardo pelas palavras de incentivo, conselhos e motivação e pela ajuda concedida.

À Sílvia e à Lena pela amizade, partilha de bons momentos e estímulos nas alturas de desânimo.

Ao Tiago pelo apoio constante, pela transmissão de confiança e força, pela paciência e compreensão, por suportar a minha ausência.

Aos meus pais pelo apoio incondicional e por acreditarem em mim, dando-me a oportunidade de concluir mais uma etapa da minha formação académica, pois sem eles não seria possível.

A todos um MUITO OBRIGADA!

Resumo

Globalmente, os ixodídeos são considerados o segundo vetor artrópode com maior importância em Saúde Pública, sendo considerável o aumento na incidência e distribuição geográfica de vírus transmitidos por estes. O número crescente de estudos direccionados para a identificação de novos vírus transmitidos por carraças, tem vindo a ser motivado por descobertas recentes de vírus patogénicos e altamente virulentos transmitidos por estes artrópodes, sendo destes exemplos, os vírus Bourbon, Several Fever with Thrombocytopenia Syndrome e Heartland. O facto de diversas espécies de carraças terem demonstrado albergar uma série de potenciais novos vírus desconhecidos, aliado à limitação no conhecimento relativo à distribuição de vírus transmitidos por carraças em Portugal, motivou o presente trabalho, que incluiu a identificação e caracterização preliminar de vírus presentes em carraças colhidas no nosso país. Os exemplares em estudo foram coletados da vegetação em vários locais dos distritos de Lisboa e Setúbal, e analisados utilizando duas abordagens distintas, uma delas dependente e a outra independente de um conhecimento prévio das sequências que viríamos a amplificar. As abordagens de *heminested*-, e *multiplex*-PCR, utilizando *primers* degenerados, foram dirigidas para dois géneros distintos *Thogotovirus* e *Phlebovirus*, cuja circulação em Portugal já fora anteriormente comprovada. Adicionalmente, foi efetuada em macerados de carraças uma abordagem de amplificação não-dirigida utilizando a técnica *Sequence - Independent Single Primer Amplification*. Das várias abordagens utilizadas neste estudo, a técnica de *multiplex*-PCR dirigida para o segmento L do genoma viral de *Phlebovirus*, foi notoriamente a que apresentou melhores resultados, tendo um grande número de *pools* revelado a presença dessas sequências virais. A análise filogenética das sequências virais obtidas revelou a segregação aparente em duas linhagens distintas de flebovírus. Os vírus detetados, sob as condições utilizadas, não conseguiram replicar em células Vero E6 e DH82. O isolamento e caracterização mais aprofundada destes vírus, bem como o seu eventual impacto na saúde humana/animal justificam, futuramente novos estudos.

Palavras-chave: *Phlebovirus*, *Thogotovirus*, carraças, SISPA, caracterização filogenética

Abstract

On a global scale, ticks are the second most important vectors responsible for transmitting infectious agents to humans, and have indisputable impact on human health, especially given the rise in the incidence and geographical distribution, in recent years, of some of the diseases these agents cause. The number of studies that describe new tick-borne viruses has been motivated by the recent discovery of some which display considerable pathogenicity towards humans, such as the Bourbon, Several Fever with Thrombocytopenia Syndrome e Heartland viruses. This work has been motivated by the fact that not only ticks seem to harbor a plethora of new viruses, but also because the distribution of most of them in Portugal is unknown. Our objectives included the identification, and preliminary characterization, of viruses associated with ticks collected in Portugal. The specimens we have studied were collected from the vegetation in southern Portugal, in the districts of Lisbon and Setubal, and they were tentatively detected using molecular methods, defined as sequence-dependent and sequence-independent approaches. Therefore, we have used heminested- and multiplex-PCR protocols using primers that were designed to specifically target sequences of viruses classified as *Thogotovirus* and *Phlebovirus*, the circulation of which has already been described in Portugal. Additionally, the presence of these viruses in tick macerates was also attempted using Sequence - Independent Single Primer Amplification which allows for viral detection without *a priori* knowledge of the targeted sequences. Of all the techniques used, the specific amplification of phleboviruses L segment-sequences using a multiplex-PCR protocol was revealed as the one allowing the detection of new viral sequences in a large number of tick macerates. Their analysis using phylogenetic inference disclosed segregation into two distinct genetic lineages. We have also shown that, under the experimental conditions used, the detected viruses were not able to readily replicate in Vero E6 or DH82 cells. A more thorough characterization of these viruses, including the assessment of their potential impact on human health should be pursued in future studies.

keywords: *Phlebovirus*, *Thogotovirus*, ticks, SISPA, phylogenetic characterization

Índice Geral

Elementos Bibliográficos resultantes da Dissertação	v
Dedicatória.....	vii
Agradecimentos	ix
Resumo	xi
<i>Abstract</i>	xiii
Índice Geral.....	xv
Índice de Figuras.....	xix
Índice de Tabelas	xxv
Lista de Abreviaturas	xxvii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. As carraças como vetor de vírus	2
1.1.1. Os principais géneros da família <i>Ixodidea</i> com interesse médico em Portugal	4
1.2. A emergência de vírus associados a carraças.....	7
1.3. O género Thogotovirus	12
1.4. O género Phlebovirus	15
1.5. Desenvolvimento das técnicas moleculares de amplificação de sequências genómicas virais.....	19
1.5.1. Amplificações dirigidas	20
1.5.2. Amplificações não-dirigidas.....	22

Índice Geral

1.6. Objetivos	25
2. MATERIAL E MÉTODOS	27
2.1. Caracterização da população de ixodídeos em estudo	28
2.2. Recolha e conservação dos ixodídeos coletados	29
2.3. Maceração das carraças	30
2.4. Extração de RNA total a partir do sobrenadante de macerados de carraças	30
2.5. Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT-PCR) a partir de RNA total	31
2.6. Delineamento dos primers e hidratação dos mesmos	33
2.7. Amplificação de sequências genômicas de Thogotovirus e Phlebovirus por heminested-PCR	34
2.7.1. Amplificação de sequências genômicas de <i>Thogotovirus</i>	35
2.7.2. Amplificação de sequências genômicas de <i>Phlebovirus</i>	36
2.8. Amplificação de sequências genômicas de CCHFV por nested-PCR	37
2.9. Amplificação de sequências genômicas de Phlebovirus por multiplex-PCR	39
2.10. PCR em tempo real dirigido para o RNA 18S de ixodídeos	40
2.11. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose	42
2.12. Isolamento de vírus em cultura celular	42
2.13. Extração de RNA total a partir de sobrenadantes de cultura	43
2.14. SISPA (Sequence-Independent Single Primer Amplification)	44
2.15. Clonagem molecular	46
2.15.1 Obtenção de células <i>E. coli</i> competentes e sua transformação	47

Índice Geral

2.15.2 Extração de DNA plasmídico por lise alcalina e digestão enzimática	48
2.15.3 Purificação de DNA plasmídico	49
2.16. Análise bioinformática	50
3. RESULTADOS	51
3.1. Detecção de sequências genómicas de Thogotovirus	52
3.2. Detecção de sequências genómicas de Phlebovirus.....	54
3.3. Detecção de sequências genómicas de CCHFV	62
3.4. Caracterização genética de sequências virais.....	63
3.5. Isolamento de vírus em cultura celular	68
3.6. Aplicação da técnica de SISPA à deteção de sequências virais em macerados de carraças.....	73
3.7. Clonagem molecular de sequências amplificadas por SISPA.....	74
4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.....	78
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	92
6. ANEXOS	104
ANEXO I	106
ANEXO II.....	107
ANEXO III.....	111
ANEXO IV.....	Erro! Marcador não definido.
ANEXO V	114
ANEXO VI.....	115
ANEXO VII	117

Índice de Figuras

Figura 1 - Distribuição geográfica dos diferentes subtipos do vírus TBEV. A amarelo está indicada a distribuição geográfica dos subtipos Orientais, os quais englobam o subtipo Siberiano e o subtipo do Extremo Oriente. A vermelho está indicada a distribuição do subtipo da Europa Ocidental, e a cor laranja a distribuição dos três subtipos em simultâneo [Adaptado (18)]......	9
Figura 2 - Representação esquemática dos viriões e segmentos genómicos que compõem o genoma dos vírus do género <i>Thogotovirus</i> [adaptado (42)].	13
Figura 3 – Relações filogenéticas entre vírus <i>Orthomixoviridae</i> inferidas através da análise da sequência de aminoácidos deduzidas para a proteína PA [adaptado de (28)].	14
Figura 4 - Representação esquemática dos viriões e da estrutura dos três segmentos (S, M e L) que compõem o genoma dos vírus do género <i>Phlebovirus</i> [adaptado de (50)]...	16
Figura 5 - Mapa representativo de descobertas esporádicas de flebovírus, sendo que os círculos indicam o local onde foram descobertos pela primeira vez [adaptado de (31)].	19
Figura 6 - Representação esquemática da técnica SISPA. As descrições técnicas estão referidas no texto acima [adaptado de (70)].	24
Figura 7- Mapa representativo dos cinco pontos de recolha dos ixodídeos em estudo, sendo que as regiões a cinzento (1 e 2) indicam os distritos de Lisboa e Setúbal.....	29
Figura 8- Representação do método PCR em tempo real com sonda <i>TaqMan</i> (indicada a verde). Os <i>primers</i> de amplificação estão representados a vermelho.....	41

Índice Figuras

Figura 9 - Esquema representativo do vetor plasmídico <i>pGEM[®]-T Easy</i>	46
Figura 10- Resultados da amplificação por PCR em tempo real dirigida para o RNA da sub-unidade ribossomal pequena (18S rRNA) de carraças. A sonda <i>TaqMan</i> utilizada foi marcada com FAM como fluoróforo e BHQ1 como <i>quencher</i> . (*) Indica as curvas de amplificação referentes à utilização de diferentes quantidades de um DNA padrão (DNA de <i>Ixodes ricinus</i>): 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 50 (fg/ul).....	53
Figura 11 - Observação de produtos da segunda reação de <i>heminested</i> -PCR resultantes da amplificação tentativa de sequências genômicas de vírus do género <i>Thogotovirus</i> , após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. M - marcador de massa molecular: <i>NZYDNA Ladder VI</i> (NZTtech). C(-) – Controlo negativo. O fragmento indicado pela seta vermelha deverá apresentar, aproximadamente, 600 nt. pb.	54
Figura 12 - Observação de produtos da segunda reação de <i>heminested</i> -PCR em que foi explorada a capacidade de amplificação de sequências genômicas do género <i>Phlebovirus</i> a partir de cDNA preparado com RNA do vírus SFNV. Os produtos de amplificação foram observados após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. M - marcador de massa molecular: <i>NZYDNA Ladder VI</i> (NZTtech). NB – testado com <i>primer</i> interno Bhanj_F2, NS – testado com o <i>primer</i> interno SFTSV_F2, NU - testado com o <i>primer</i> interno UukcPhle_F2. CB-, CS- e CU- – Controlos negativos com os respetivos <i>primers</i>	56
Figura 13 - Observação de produtos da reação de <i>multiplex</i> -PCR resultantes da amplificação de sequências genômicas do género <i>Phlebovirus</i> rastreados com os conjuntos de <i>primers</i> ppL1 e ppL2, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. M - marcador de massa molecular: <i>NZYDNA Ladder VI</i> (NZTtech). C(-) – controlo negativo. O retângulo indica o produto de amplificação com as dimensões esperadas (500pb).	59
Figura 14 - Observação de produtos da reação de <i>multiplex</i> -PCR resultantes da amplificação de sequências genômicas do género <i>Phlebovirus</i> , rastreados com os conjuntos de <i>primers</i> ppL1 e ppL2, após a sua separação por eletroforese em gel de	

Índice Figuras

agarose a 1%. M - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). 26P- controlo positivo, cDNA do extrato 26. C(-) – controlo negativo..... 62

Figura 15 - Observação dos produtos da segunda reação de *nested*-PCR resultantes da amplificação de sequências genómicas de CCHFV, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. M - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech, Portugal). C(-) – controlo negativo. 63

Figura 16 – Relações filogenéticas entre sequências parciais do segmento L do genoma de *Phlebovirus*. (A) Árvore filogenética construída com base no método de junção de vizinhos (NJ), utilizando como modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros, a partir de 23 sequências amplificadas e 104 sequências virais de referência de *Phlebovirus*. (B) Árvore filogenética construída pelo método de máxima verosimilhança (ML), utilizando como modelo GTR+I+ Γ , a partir de 23 sequências amplificadas e 42 sequências de referência. A barra representa a percentagem de distância genética. 68

Figura 17 – Observação por microscopia ótica de células Vero E6 (ampliação de 200x), no final da primeira semana. (1) Células Vero E6 não inoculadas (cultura controlo). (2) Células Vero E6 inoculadas com os macerados 8 e 10. (3) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 19. (4) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 23. (5) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 24. (6) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 40. (7) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 50. (8) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 51. (9) Células Vero E6 inoculadas com os macerados 68, 70 e 72..... 69

Figura 18 - Observação por microscopia ótica de células Vero E6 (ampliação de 200x), no final da segunda semana. (1) Células Vero E6 não inoculadas (cultura controlo). (2) Células Vero E6 inoculadas com os macerados 8 e 10. (3) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 19. (4) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 23. (5) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 24. (6) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 40. (7) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 50. (8) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 51. (9) Células Vero E6 inoculadas com os macerados 68, 70 e 72..... 70

Índice Figuras

Figura 19 - Observação de produtos da reação de *multiplex*-PCR dirigida à amplificação de sequências genómicas do género *Phlebovirus*, rastreados com os conjuntos de *primers* ppL1 e ppL2, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. M - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). (A) Inóculo e sobrenadantes de cultura do macerado 50. (B) Inóculo e sobrenadantes de cultura dos macerados 68,70 e 72. I – inóculo; 1 – sobrenadante da primeira semana; 2 – sobrenadante da segunda semana; 3 – sobrenadante da terceira semana; V – sobrenadante da cultura controlo; C- – controlo negativo..... 71

Figura 20 - Observação por microscopia ótica de células DH82 (ampliação de 200x), no final da primeira semana. (1) Células DH82 não inoculadas (cultura controlo). (2) Células DH82 inoculadas com os macerados 55 e 74. 71

Figura 21 - Observação por microscopia ótica de células DH82 (ampliação de 200x), no final da segunda semana. (1) Células DH82 não inoculadas (cultura controlo). (2) Células DH82 inoculadas com os macerados 55 e 74. 72

Figura 22 - Observação de produtos da reação de *multiplex*-PCR resultantes da amplificação de sequências genómicas do género *Phlebovirus*, no inóculo e sobrenadantes de cultura do macerado 55 e 74, rastreados com os conjuntos de *primers* ppL1 e ppL2, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. M - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). I – inóculo; 1 – sobrenadante da primeira semana; 2 – sobrenadante da segunda semana; 3 – sobrenadante da terceira semana; V – sobrenadante da cultura controlo; C- – controlo negativo..... 73

Figura 23 - Observação de produtos de PCR obtidos através da técnica SISPA, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. (A) A partir de macerados (B) A partir de sobrenadante de cultura da primeira semana dos macerados 68+70+72. M - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). SC – sobrenadante de cultura. C- - controlo negativo..... 74

Figura 24 – Perfil electroforético resultante da digestão pela enzima *EcoRI* de clones plasmídicos recombinantes, contendo amplicões obtidos através de SISPA, referentes ao

Índice Figuras

maceração 20. O retângulo em cima apresentado corresponde à zona de bandas respetiva ao vetor plasmídico linearizado (3kpb). As setas assinaladas na figura representam bandas de interesse que posteriormente foram purificadas. 75

Índice de Tabelas

Tabela 1 - <i>Primers</i> delineados no decurso deste trabalho, de forma a poderem ser utilizados nas reações de amplificação de sequências genômicas virais de vírus dos géneros <i>Thogotovirus</i> e <i>Phlebovirus</i>	34
Tabela 2 - Composição e volumes utilizados em cada uma das três segundas reações de PCR (segundo ciclo de amplificações), no rastreio de <i>Phlebovirus</i>	36
Tabela 3 - Sequências nucleotídicas dos <i>primers</i> utilizados na deteção de genoma de CCHFV por <i>nested</i> -PCR. As temperaturas de desnaturação (TM) foram calculadas com recurso à ferramenta <i>TM Calculator</i> , tal como descrito no texto. As coordenadas indicadas correspondem às posições relativas das sequências dos <i>primers</i> na sequência de referência depositada no GenBank com o número de acesso KF595138.	38
Tabela 4 - Sequências e designações dos <i>primers</i> descritos por Matsuno et al. (31) e utilizados na amplificação de sequências genômicas de <i>Phlebovirus</i> por <i>multiplex</i> -PCR.	39
Tabela 5 - Tabela relativa aos resultados dos rastreios efetuados. Rh.s – Rhipicephalus sanguineus; Rh.b – Rhipicephalus bursa; De.m – Dermacentor marginatus; Hy – Hyalomma marginatum.	61

Lista de Abreviaturas

°C	graus <i>Celsius</i>
μg	micrograma (s) = 10 ⁻⁶ grama
μl	microlitro (s) = 10 ⁻⁶ litro
μm	micrómetro (s) = 10 ⁻⁶ metro
A, C, G,T	bases orgânicas constituintes dos nucleótidos (adenina, citosina, guanina e timina, respetivamente)
ASFV	do inglês <i>African Swine Fever Virus</i>
B	C, G ou T (posição nucleotídica degenerada)
BHQ1	do inglês <i>Black Hole Quencher -1</i>
BLAST	ferramenta bioinformática, do inglês <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
CCHFV	vírus da febre hemorrágica Crimeia- Congo, do inglês <i>Crimeia-Congo Hemorrhagic Fever Virus</i>
cDNA	ácido desoxirribonucleico complementar
CO ₂	dióxido de carbono
CPE	efeito citopático, do inglês <i>Cytopathic Effect</i>
D	A, G ou T (posição nucleotídica degenerada)
De.	<i>Dermacentor</i>
DEPC	Dietil pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>

Lista de Abreviaturas

DNase	Desoxirribonuclease
dNTPs	Desoxirribonucleótidos 5'-trifosfatados
dsDNA	Ácido desoxirribonucleico de cadeia dupla
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético, do inglês <i>Ethylene Diamine Tetracetic Acid</i>
EUA	Estados Unidos da América
EVOA Estuário do Tejo	Espaço de Visitação e Observação de Aves na Reserva Natural do Estuário do Tejo
FAM	Amidita de fluoresceína, inglês <i>Fluorescein AMidite</i>
G	unidade de campo gravitacional, utilizada como unidade de força centrífuga relativa
H	A, C ou T (posição nucleotídica degenerada)
<i>Ha.</i>	<i>Haemaphysalis</i>
H₂O	Água
<i>Hy.</i>	<i>Hyalomma</i>
I	Inosina
<i>Ix.</i>	<i>Ixodes</i>
<i>i.e.</i>	isto é
ICTV	do inglês <i>Internacional Committee on Taxonomy of Viruses</i>
IHMT	Instituto de Higiene e Medicina Tropical
IPTG	IsoPropil-β-D-TioGalactopiranosido

Lista de Abreviaturas

K	G ou T (posição nucleotídica degenerada)
Kpb	Kilo pares de bases = 10^3 pares de bases
LB	Meio de <u>L</u> uria- <u>B</u> ertani
M	A ou C (posição nucleotídica degenerada)
MAFFT	Programa bioinformático de alinhamentos múltiplos, do inglês <i><u>M</u>ultiple <u>A</u>lignment using <u>F</u>ast <u>F</u>ourier <u>T</u>ransform</i>
Mg	milígrama (s) = 10^{-3} grama
ml	mililitro (s) = 10^{-3} litro
ML	Máxima verosimilhança, do inglês <u>M</u> aximum <u>L</u> ikelihood
Mm	milimolar = 10^{-3} molar
ng	nanograma (s) = 10^{-9} grama
NGS	do inglês <i><u>N</u>ext <u>G</u>eneration <u>S</u>equencing</i>
NJ	Junção de Vizinhos, do inglês <i><u>N</u>ighbor-<u>J</u>oining</i>
nm	nanómetro (s) = 10^{-9} metro
NP	do inglês <i><u>n</u>ucleo<u>p</u>rotein</i>
nt	nucleótido
OHFV	do inglês <i><u>O</u>msk <u>H</u>aemorrhagic <u>F</u>ever <u>V</u>irus</i>
PA	do inglês <i><u>P</u>olymerase <u>a</u>cidic protein</i>
Pb	pares de bases
PB1	do inglês <i><u>P</u>olymerase <u>b</u>asic protein <u>1</u></i>
PB2	do inglês <i><u>P</u>olymerase <u>b</u>asic protein <u>2</u></i>

Lista de Abreviaturas

PBS	solução de soro fisiológico tamponada com fosfatos, do inglês <i><u>Phosphate-Buffered Saline</u></i>
PCR	reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i><u>Polymerase Chain Reaction</u></i>
pH	potencial hidrogeniônico
pmol	picomole = 10^{-12} moles p/v
Poly-A	cauda poliadenilada
R	A ou G (posição nucleotídica degenerada)
Rh.	<i>Rhipicephalus</i>
RCA	do inglês <i><u>Rolling Circle Amplification</u></i>
RDA	do inglês <i><u>Representational Difference Analysis</u></i>
REVIVE	<i><u>Rede de Vigilância de Vetores</u></i>
RNA	ácido ribonucleico, do inglês <i><u>Ribonucleic Acid</u></i>
RNase	Ribonuclease
rPCR	do inglês <i><u>random PCR</u></i>
rpm	rotações por minuto
rRNA	ácido ribonucleico ribossomal
RT	transcriptase reversa, do inglês <i><u>Reverse Transcription</u></i>
RT – PCR	reação de transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase de DNA, do inglês <i><u>Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction</u></i>
S	G ou C (posição nucleotídica degenerada)
SDS	dodecil sulfato de sódio, do inglês <i><u>Sodium Dodecyl Sulfate</u></i>

Lista de Abreviaturas

SFTSV	do inglês <i><u>S</u>everal <u>F</u>ever with <u>T</u>hrombocytopenia <u>S</u>yndrome <u>V</u>irus</i>
SISPA	do inglês <i><u>S</u>equence - <u>I</u>ndependent <u>S</u>ingle <u>P</u>rimer <u>A</u>mplification</i>
TAE	tampão <u>T</u> ris- <u>a</u> cetato <u>E</u> DTA
TBEV	do inglês <i><u>T</u>ick-<u>B</u>orne <u>E</u>ncephalitis <u>V</u>irus</i>
TE	tampão <u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
TEG	tampão Tris-EDTA-Glucose
TM	temperatura de desnaturação, do inglês <i><u>m</u>elting <u>t</u>emperature</i>
TSS	do inglês <i><u>T</u>ransformation and <u>S</u>torage <u>S</u>olution</i>
UV	radiação eletromagnética ultravioleta
V	A, C ou G (posição nucleotídica degenerada)
VIDISCA	do inglês <i><u>V</u>irus <u>D</u>iscovery <u>c</u>DNA-<u>A</u>FLP</i>
Vs	<i>versus</i>
W	A ou T (posição nucleotídica degenerada)
X-gal	5-bromo-4-cloro-3-indoxil- β -D-galactopiranosídeo
Y	C ou T (posição nucleotídica degenerada)

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. As carraças como vetor de vírus

Os ixodídeos, popularmente designados por carraças, são artrópodes, ectoparasitas hematófagos obrigatórios, sendo o artrópode vetor com maior importância em Saúde Pública depois dos mosquitos (1). Dividem-se em três famílias, sendo que uma delas (Nuttalliellidae) é constituída apenas por uma única espécie, sem aparente importância médica ou veterinária, já que o seu papel na eventual transmissão de agentes patogénicos é desconhecido (2). As demais duas grandes famílias, *Ixodidae* (designadas de carraças de corpo duro) e *Argasidae* (carraças de corpo mole) albergam, aproximadamente, cerca de 700 e 200 espécies respetivamente (1).

As carraças parasitam um vasto número de hospedeiros aos quais podem transmitir uma ampla gama de agentes patogénicos, sendo eles virais, bacterianos ou parasitas. Muitos destes agentes estabelecem infeções persistentes nas carraças infetadas, sendo transmitidos diretamente à fase de desenvolvimento seguinte, e/ou à geração seguinte através da sua dispersão direta nos ovos (ver abaixo) (3). Embora sejam essencialmente zoofílicas, as carraças podem, acidentalmente, parasitar o Homem. Ao longo das últimas décadas tem-se assistido a um aumento quer na incidência, quer na distribuição geográfica, de doenças transmitidas por carraças, pelo que o seu futuro na Saúde Pública poderá ainda tornar-se mais significativo do que já o é hoje em dia (4). A emergência, ou re-emergência, de doenças associadas a este vetor tem, por esta razão, conduzindo a um incremento do número de estudos nelas centrados.

O ciclo de vida das carraças compreende uma fase inativa (o ovo) e três fases ativas (larva, ninfa e adulto). Após o acasalamento, as fêmeas engorgitadas fazem posturas de milhares de ovos entre a vegetação em decomposição, os quais, depois de eclodirem, libertam larvas que sobem à vegetação em busca de um hospedeiro para efetuar uma refeição sanguínea. Estas formas larvares, quando alimentadas, soltam-se novamente para o chão, onde evoluem para a fase de desenvolvimento

Introdução

seguinte. Este ciclo repete-se nas fases que se precedem (ninfas e adultos). Na maioria das espécies, ao longo do seu ciclo de vida as carrapatos parasitam três hospedeiros. No entanto existem aquelas que parasitam apenas dois hospedeiros (larvas e ninfas alimentam-se do mesmo hospedeiro), ou mesmo espécies que parasitam apenas um hospedeiro vertebrado. Habitualmente, mas não obrigatoriamente, as fases imaturas (larva e ninfa) parasitam pequenos animais (roedores, aves e micromamíferos), enquanto os adultos alimentam-se em animais de maior porte. Uma vez que, e à exceção do ovo, em todas as restantes fases de desenvolvimento as carrapatos necessitam de efetuar uma refeição de sangue para passar à fase de desenvolvimento seguinte, elas podem integrar-se na cadeia epidemiológica de transmissão de agentes patogénicos (4). Em cada fase de desenvolvimento do seu ciclo de vida, as carrapatos conseguem sobreviver por longos períodos de tempo sem efetuar uma refeição sanguínea, sendo que essa excecional longevidade lhes permite transportar agentes patogénicos por períodos de tempo prolongados, conferindo-lhes, em adição ao seu papel enquanto vetor, o papel de hospedeiro reservatório desses agentes (5).

Se, por um lado, as peculiaridades do seu ciclo de vida conferem às carrapatos, por si só, a reputação de bons vetores de agentes patogénicos, existem ainda outras características que lhes são únicas e que lhes conferem sucesso notório. Nomeadamente, é destas exemplo o facto dos eventos de metamorfose não envolverem a degeneração total dos órgãos do animal. Consequentemente, é possível a transmissão transtadial de agentes patogénicos; por outro lado, no caso de ocorrer a invasão do sistema reprodutor, estes agentes podem ser transmitidos à prole (transmissão transovárica) (6).

Das 904 espécies ixodológicas conhecidas, menos de 10 % desempenham um papel enquanto vetores de vírus. Dentro da família *Ixodidae* essas espécies são, na sua maioria, pertencentes aos géneros *Ixodes*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, *Haemaphysalis*, *Amblyomma* e *Rhipicephalus*. Referente à família *Argasidae*, as espécies que cumprem esse papel abrangem essencialmente os géneros *Ornithodoros*, *Carios* e *Argas* (7).

Introdução

A família *Ixodidae* é a que tem maior relevância médica e veterinária pelo facto de incluir inúmeras espécies implicadas na transmissão de agentes patogénicos. Esta família é caracterizada pelos seus membros apresentarem um escudo quitinoso rígido na superfície dorsal de todos os estádios ativos (larva, ninfas e adultos). Em Portugal, estão presentes 21 espécies pertencentes a esta família (8).

1.1.1. Os principais géneros da família *Ixodidae* com interesse médico em Portugal

Portugal apresenta inúmeras condições favoráveis ao desenvolvimento de várias espécies ixodológicas. À semelhança do que acontece um pouco por toda a Europa Ocidental, os géneros que mais se destacam pela sua relevância em Saúde Pública incluem *Rhipicephalus*, *Ixodes*, *Dermacentor*, *Hyalomma*, e *Haemaphysalis*.

Em Portugal, o género *Rhipicephalus* compreende, entre outras, duas importantes espécies designadas *Rhipicephalus sanguineus* e *Rhipicephalus bursa*. *Rhipicephalus sanguineus* é a espécie que detém maior importância devido à sua abundância. Segundo os dados da rede REVIVE 2011-2015 (Rede de Vigilância de Vetores), trata-se da espécie que apresentou em 2015 uma abundância relativa de 82,2% (mais 13,1 % comparado com os dados do ano de 2013), sendo considerada a espécie mais abundante em termos nacionais, sendo encontrada de norte a sul do país (Portugal continental). Esta espécie está adaptada ecologicamente a todos os ambientes, apresentando uma distribuição mundial. Apesar de estar particularmente associada ao cão, parasita todos os animais domésticos e inúmeros animais silváticos, estando também, ocasionalmente, associada a mordeduras infringidas ao Homem. A maior densidade populacional é encontrada nos meses mais quentes do ano (9). Esta espécie está associada aos primeiros isolados do vírus *Thogoto* (*Thogotovirus*, *Orthomyxoviridae*), tendo os espécimes onde este vírus foi encontrado sido coletados em bovinos na floresta de Thogoto, no Quénia em 1960 (ver seções seguintes). É, igualmente, um potencial vetor do vírus da febre

Introdução

hemorrágica Crimeia e Congo (CCHFV, do inglês *Crimeia-Congo Hemorrhagic Fever Virus*; *Nairovirus*, *Bunyaviridae*) (10). Dentro do género *Rhiphicephalus* destaca-se ainda a espécie *Rhiphicephalus bursa* pela sua importância sobretudo ao nível veterinário. Esta espécie é encontrada em todo o território de Portugal continental, e a sua distribuição mundial recai sobre o norte de África, a Europa e a Ásia. Segundo os dados do relatório REVIVE 2011–2015, *Rh. bursa* apresentou uma abundância relativa inferior a 1% (em 2013 a abundância foi de 13,3%). À semelhança de *Rh. sanguineus*, esta espécie está também adaptada do ponto de vista ecológico a todos os ambientes. Ainda que tenha já sido responsável por mordeduras ocasionais em humanos, os seus hospedeiros preferenciais incluem ruminantes como a cabra, a ovelha e a vaca. As maiores densidades populacionais de *Rh. bursa* são normalmente registadas no mês de julho (8,9). Esta espécie é incriminada como potencial vetor de CCHFV, assim como dos vírus *Bhanja* (*Phlebovirus*, *Bunyaviridae*) e *Thogoto* (10).

O género *Ixodes* alberga, por seu lado, uma das espécies de maior importância médica, *Ixodes ricinus*, e que pode ser encontrada em todo o território nacional (continental). A sua expansão geográfica em termos mundiais estende-se pela Europa, pelo norte de África e pela Ásia Menor. Esta espécie está adaptada a ambientes que exibam uma cobertura vegetal considerável e onde se registem elevados níveis de humidade relativa. A gama de hospedeiros desta espécie abrange tanto mamíferos domésticos e silváticos, assim como aves e lacertídeos (família de répteis escamados pertencentes à subordem Sauria), sendo também frequente parasitar o Homem. No ano de 2015, *Ix. ricinus* apresentou uma abundância relativa de 3,5% em Portugal, tendo sido relatada uma maior abundância populacional nos meses de outono-inverno (9). *Ixodes ricinus* é o principal vetor do vírus da encefalite das carraças, TBEV (do inglês *Tick-Borne Encephalitis Virus*; *Flavivirus*, *Flaviviridae*), que é, sem dúvida, o agente etiológico de doença transmitido por carraças mais importante na Europa (11). As carraças desta espécie são vetoras predominante do vírus *Uukuniemi* (*Phlebovirus*, *Bunyaviridae*) e também vetor dos vírus *Eyach* (*Coltivirus*, *Reoviridae*), *Kemerovo*, *Kharagysh*, *Lipovnik*, *Tribeč*

Introdução

(*Orbivirus*, *Reoviridae*). Embora menos frequentemente, pode ainda ser vetor de CCHFV (5,10).

Dentro do género *Dermacentor* estão inseridas duas importantes espécies de ixodídeos com potencial impacto na Saúde Pública: *Dermacentor marginatus* e *Dermacentor reticulatus*. A espécie *De. marginatus* distribui-se geograficamente pela Europa, Ásia e norte de África, e de norte a sul no território nacional (continental), encontrando-se essencialmente em regiões de clima temperado e seco. A sua gama de hospedeiros compreende quase a totalidade dos mamíferos domésticos e silváticos, e inclui também o Homem. A maior densidade populacional desta espécie, em Portugal, é encontrada nos meses de outubro e novembro, tendo apresentado em 2015 uma abundância relativa de 4,3% (9). Os espécimes desta espécie podem ser vetores dos vírus *Dhori* (*Thogotovirus*, *Orthomyxoviridea*) e *Bhanja*, podendo ainda, ocasionalmente, transmitir os vírus CCHFV e TBEV. A espécie *De. reticulatus* tem uma distribuição geográfica mais reduzida, restringindo-se à Europa e Ásia, enquanto que, em termos nacionais, apenas é encontrada no norte do país. Esta espécie necessita de humidade relativa para sobreviver, e é capaz de suportar temperaturas negativas. Apresenta, ainda, como hospedeiros preferenciais ungulados selvagens, e ocasionalmente pode parasitar o Homem. Em Portugal no ano de 2015, a sua abundância relativa registada foi de 1% (9). *Dermacentor reticulatus* é o principal vetor do vírus da febre hemorrágica de Omsk, OHFV (do inglês *Omsk Hemorrhagic Fever Virus*; *Flavivirus*, *Flaviviridae*) (10).

O género *Hyalomma* abriga uma espécie de grande relevância médica, designada *Hyalomma marginatum*, que pode ser encontrada na Europa, Ásia e África. Em Portugal pode ser encontrada em todo o território continental, mas tem uma distribuição mais homogénea no sul do país. Esta espécie parasita, essencialmente, animais domésticos e aves, e acidentalmente o Homem. *Hyalomma marginatum* apresentou no ano de 2015, em Portugal, uma abundância relativa de 2,4% (9). Esta espécie é o principal vetor do vírus CCHFV, que é considerado um dos principais vírus emergentes, e que ameaça espalhar-se pela Europa (12). É também um vetor dos vírus *Bahig e Matruh* (*Ortthobunyavirus*, *Bunyaviridae*), *Bhanja* (*Phlebovirus*,

Introdução

Bunyaviridae), e *Dhori* (*Thogotovirus*, *Orthomyxoviridae*), e ainda que esporadicamente, do vírus TBEV (10). *Hyalomma lusitanicum* é igualmente uma espécie do género *Hyalomma*, com relevância em termos de Saúde Pública pela sua capacidade em transmitir CCHFV. A sua distribuição geográfica recai sobre o sul da Europa e norte de África, em Portugal (continental) distribui-se pelo sul do país, apresentado em 2015 uma abundância relativa inferior a 1% (9).

Dentro do género *Haemaphysalis* a espécie que mais se destaca é *Haemaphysalis punctata*. Esta espécie pode ser encontrada de norte a sul do país e a sua distribuição geográfica recai sobre a Europa e a África Mediterrânica, tendo preferência por zonas de clima temperado a seco. As carraças desta espécie têm como hospedeiros animais domésticos, podendo também parasitar animais silváticos e aves. Em Portugal, no ano de 2015, apresentou uma abundância relativa inferior a 1% (6,9). A partir desta espécie foi isolado, em Portugal, o vírus Palma, em 1992 (13), que pertence ao grupo antigénico Bhanja (ver seções seguintes). Esta espécie também é vetor dos vírus *Tribeč*, TBEV e CCHFV (10).

1.2. A emergência de vírus associados a carraças

Durante as últimas décadas tem-se registado um aumento considerável de epidemias associadas a arbovírus (do inglês *arthropod-borne virus*). Estes agentes representam o maior grupo biológico de vírus de vertebrados, abrangendo mais de 70% daqueles que infetam o Homem. Estes vírus são unificados por uma característica ecológica única: o facto de serem transmitidos por artrópodes hematófagos, que por eles são sistemicamente infetados. São conhecidos mais de 500 arbovírus, dos quais um terço são transmitidos por carraças (5,14,15). À semelhança do que se verifica com a grande maioria dos arbovírus conhecidos, quase todos os que são transmitidos por carraças têm genoma de RNA e são

Introdução

geneticamente variáveis. Tal facto deve-se, não só às elevadas taxas de erros causados pelas polimerases de RNA virais que replicam os seus genomas, mas também à possibilidade de redistribuição de segmentos genómicos no caso de vírus com genomas segmentados (15). A única exceção a realçar é protagonizada pelo vírus da peste suína africana (ASFV; do inglês *African swine fever virus*), incluído na família *Asfarviridae*, sendo este o único arbovírus com genoma de DNA. Este vírus é responsável por uma doença hemorrágica devastadora em suínos, apresentando uma alta letalidade. Tendo recentemente reemergido em muitos países, na União Europeia os primeiros casos notificados recentemente datam de 2014. No entanto, tem vindo a espalhar-se rapidamente, ameaçando a indústria suína (16).

De entre os arbovírus transmitidos por carraças na Europa, os vírus TBEV e CCHFV são considerados como vírus emergentes e com grande impacto na Saúde Pública (17). O vírus TBEV pertence ao género *Flavivirus*, é responsável por infeções neurológicas graves em seres humanos, tendo como principais vetores as espécies *Ix. ricinus* e *Ix. persulcatus*, ainda que possa infetar mais de 14 espécies de carraças. O vírus TBEV foi descrito inicialmente na Áustria em 1931 e isolado pela primeira vez na Rússia em 1937. Abrange três subtipos: o subtipo da Europa Ocidental, o Siberiano e o do Extremo Oriente, cujas distribuições geográficas podem ser observadas na Figura 1. Este vírus tem sido relatado em 28 países, tendo-se estimado mundialmente 10 a 12 mil casos clínicos por ano, sendo que esta incidência tem vindo a aumentar na Europa nos últimos 15 anos, além de se ter expandido a novas áreas (18).

Introdução

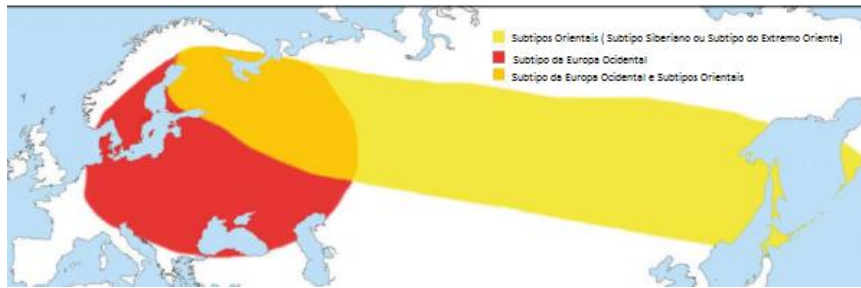


Figura 1 - Distribuição geográfica dos diferentes subtipos do vírus TBEV. A amarelo está indicada a distribuição geográfica dos subtipos Orientais, os quais englobam o subtipo Siberiano e o subtipo do Extremo Oriente. A vermelho está indicada a distribuição do subtipo da Europa Ocidental, e a cor laranja a distribuição dos três subtipos em simultâneo [Adaptado (18)].

Nos últimos 10 anos tem-se assistido igualmente a uma (re)emergência do vírus CCHFV, membro do género *Nairovirus*, o qual pode dar origem a uma síndrome febril, com manifestações hemorrágicas, estando associado quer a casos de infeção esporádicos ou grandes surtos (19). As carraças do género *Hyalomma* são os principais vetores deste vírus, e a ocorrência de casos de infeção a CCHFV aproxima-se da distribuição mundial destes artrópodes (20). Apesar de este vírus ser mantido na natureza pelo género *Hyalomma*, outros géneros como *Dermacentor*, *Amblyomma*, *Rhipicephalus* e *Haemaphysalis* demonstraram abrigar quer naturalmente, quer depois de experimentalmente infetados, o vírus CCHFV. No entanto, existem poucas evidências que demonstrem uma real capacidade de transmissão natural ou manutenção do vírus por espécies de ixodídeos dos géneros não-*Hyalomma* (19). O vírus CCHFV foi originalmente isolado, de forma independente, na Crimeia e na República Democrática do Congo, tendo sido demonstrado, mais tarde, que os isolados virais assim obtidos eram idênticos (5). Relatos de manifestações clínicas semelhantes à doença viral causada por CCHFV existem desde o século XII. No entanto, esta síndrome só foi descrita pela primeira vez em 1944 quando um surto de CCHFV infetou cerca de 200 militares na Crimeia (20). Ao longo das décadas seguintes foram inúmeras vezes relatados casos esporádicos ou surtos, na antiga União Soviética, sudeste da Europa, Ásia oriental e central, Médio Oriente e em África. A sua incidência e distribuição geográfica sofreram um aumento considerável desde o início da década de 2000. A Turquia é

Introdução

hoje considerada um dos locais onde é mais provável podermos vir a detetar o CCHFV. Ainda que os primeiros casos de infeção tenham sido apenas registados oficialmente em 2002, desde então mais de 6300 infeções foram já diagnosticadas (21). Na Península Ibérica, a presença do vírus foi demonstrada em 2011 através da deteção, em Espanha, de RNA de CCHFV em *Hy. lusitanicum* (21), e muito recentemente (agosto de 2016) foram confirmados dois casos de infeção a CCHFV, tendo inclusive resultado numa vítima mortal (22). No entanto, em 1985 já teria sido reportada a deteção de anticorpos anti-CCHFV em soros humanos em Portugal (23). Esta atividade sugere uma presença limitada do vírus na Península Ibérica (24).

Para além dos dois vírus TBEV e CCHFV, os quais são, de entre os vírus transmitidos por carraças os que têm maior significância em termos de Saúde Pública, muitos outros vírus por elas transmitidos são responsáveis por causar doenças graves em humanos. De entre os vírus (re)emergentes, salientamos como exemplos os vírus OHFV, o vírus *Louping ill* e o vírus *Powassan* (25–27). No entanto, pelo facto de serem menos frequentes ou apresentarem uma baixa patogenicidade para o Homem e, por consequência, serem frequentemente sub-diagnosticados (10), muitos dos vírus transmitidos por carraças só recentemente têm sido estudados em associação a casos de doença humana.

Para além da (re)emergência de vírus já anteriormente conhecidos, novos arbovírus continuam a ser descobertos sempre que uma pesquisa é feita, tendo esta década sido marcada pela tendência crescente em isolar e/ou descrever novos arbovírus (15). A descoberta de novos vírus patogénicos transmitidos por carraças sugere que a importância em Saúde Pública destes vírus tem vindo a ser subestimada. O vírus *Bourbon* é um exemplo disso. Descoberto em 2014 no Kansas (EUA) após ter causado a morte de um homem, este vírus foi caracterizado enquanto membro do género *Thogotovirus* (28), género esse que tem marcado a sua presença em Portugal pelo isolamento do vírus *Dhori* em 1971 e duas estirpes do vírus *Thogoto* em 1978 (29,30).

O estudo dos flebovírus (*Phlebovirus*, *Bunyaviridae*) transmitidos por carraças tinha sido negligenciado até ao surgimento recente, de dois vírus patogénicos

Introdução

altamente virulentos (31). Isolado em 2010 na China, o vírus da síndrome grave com trombocitopenia (SFTSV; do inglês *Severe Fever with Thrombocytopenia Syndrome Virus*), é o agente etiológico de uma doença hemorrágica grave, amplamente distribuída na China, Coreia do Sul e Japão, caracterizada por um quadro clínico que inclui febre, trombocitopenia, leucocitopenia e disfunção de múltiplos órgãos. Este vírus tem como principal vetor a espécie *Haemaphysalis longicornis* (31–33). O vírus Heartland, outro membro do género *Phlebovirus* recém-descoberto nos Estados Unidos (de facto trata-se do primeiro vírus patogénico deste género descrito na América do norte), está estritamente relacionado do ponto de vista filogenético com o SFTSV. Este vírus, transmitido pela espécie *Amblyomma americanum*, provoca doença grave com manifestações que incluem febre, fadiga, diarreia, trombocitopenia e leucopenia (34).

A identificação de vírus patogénicos para o Homem surge sempre como a principal motivação que suporta estudos que visam a caracterização de novos vírus, os quais, mais recentemente, exploram as possibilidades técnicas do que se designa por metagenómica, *i.e.* o estudo da totalidade do material genético presente numa amostra biológica. Nos últimos anos, motivados por estas descobertas, muitos flebovírus têm sido descritos ou caracterizados geneticamente. No entanto, frequentemente o isolamento destes vírus não acompanha a sua descrição, pelo que a definição da sua gama de eventuais hospedeiros e a avaliação da sua eventual patogenicidade em relação ao Homem permanecem por esclarecer. Ainda muito recentemente, um novo agrupamento de flebovírus transmitido por carraças, geneticamente distinto dos demais, foi identificado na Grécia em carraças *Rh. sanguineus* (35). Apesar deste facto, no sul da Europa poucos são os estudos focados na análise de flebovírus transmitidos por carraças, pelo que existe uma óbvia falta de informação referente a esse grupo de vírus nesta área geográfica. No entanto, a circulação de flebovírus patogénicos para o Homem em Portugal foi marcada com o isolamento de um destes vírus (vírus Palma) em 1992 a partir de *Ha. punctata* (13). Muito provavelmente, a implementação de uma vigilância ativa, como tem ocorrido na China, aliada aos avanços na análise metagenómica, deverá

Introdução

permitir que, num futuro próximo, mais destes vírus transmitidos por carraças venham a ser descobertos (36).

1.3. O género *Thogotovirus*

O género *Thogotovirus*, assim denominado por referência ao vírus *Thogoto*, isolado pela primeira vez em 1960 de *Rh. sanguineus* coletados em bovinos na Floresta de Thogoto no Quênia (10), foi reconhecido pelo ICTV (do inglês *Internacional Committee on Taxonomy of Viruses*) em 1996 (37), como um novo género da família *Orthomyxoviridae*. Esta família, caracterizada por compreender vírus com genomas lineares segmentados (seis a oito segmentos) de RNA de cadeia simples com polaridade negativa, alberga adicionalmente mais seis géneros, *Isavirus*, o recentemente proposto *Quarjavirus* (38), e *Influenzavirus* A, B, C e D (39,40), sendo os primeiros destes (conhecidos geneticamente como vírus da gripe A) responsáveis por epidemias/pandemias de gripe (41).

Os vírus incluídos no género *Thogotovirus* apresentam geralmente viriões esféricos de 80 a 120 nm de diâmetro, que são limitados por um invólucro lipídico derivado da membrana celular das células que os replicam, e que suporta projeções da glicoproteína de superfície (Figura 2). Cada um dos segmentos do genoma viral corresponde a uma molécula de RNA linear, de cadeia simples com polaridade negativa, encapsidada em associação a nucleoproteínas. Este genoma contém entre seis a sete segmentos que codificam sete a nove proteínas. O tamanho total do genoma é de cerca de 10 kpb, sendo que o tamanho dos diferentes segmentos varia entre 0,9 a 2,3 kpb. Cada um destes possui regiões conservadas e sequências semi-complementares nas extremidades 3' e 5', ambas necessárias para garantir a atividade do promotor de transcrição em cada um deles. Estes vírus fazem uso de um mecanismo de *cap-snatching* único (5,42).

Introdução

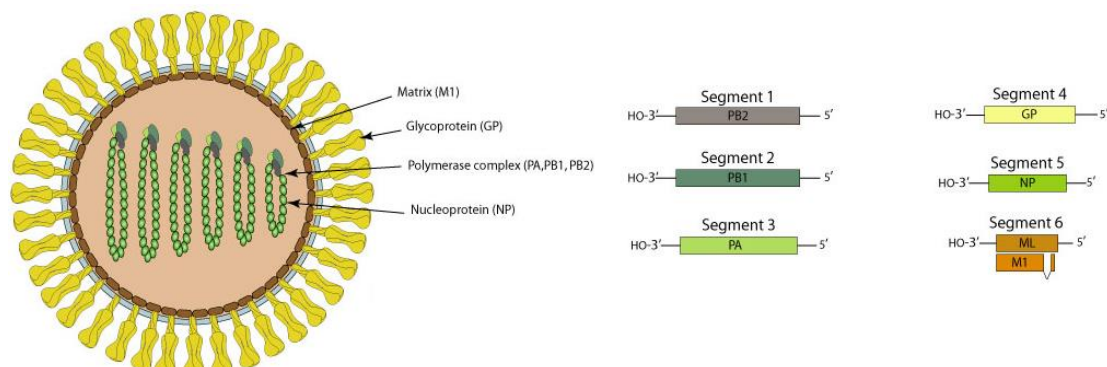


Figura 2 - Representação esquemática dos viriões e segmentos genômicos que compõem o genoma dos vírus do gênero *Thogotovirus* [adaptado (42)].

Os segmentos que codificam as proteínas que compõem a polimerase viral (PB1, PB2 e PA), bem como o segmento cujo produto é a proteína da nucleocápside (NP), partilham um ancestral comum com os encontrados nos vírus do gênero *Influenzavirus*. No entanto, o segmento 4 que codifica a proteína de superfície, é também homólogo ao segmento cuja sequência codifica a glicoproteína gp64 de *Baculovirus* (vírus que infectam artrópodes, membros da família *Baculoviridae*) (43). Esta proteína é provavelmente a responsável pela capacidade que os togotovírus apresentam para infectar carraças, uma vez que os *Influenzavirus* utilizam como recetores os resíduos de ácido siálico, e as carraças são desprovidas destes recetores (5,41).

A primeira espécie deste género, o vírus *Thogoto*, está associada a infeções humanas com manifestações clínicas que incluem encefalite e meningoencefalite (44). A sua distribuição geográfica abrange os continentes Africano, Europeu, e Asiático, sendo transmitido pelas espécies dos géneros *Amblyomma*, *Hyalomma* e *Rhipicephalus* (5,45). O vírus *Dhori*, uma outra espécie do género *Thogotovirus*, é transmitido por carraças do género *Hyalomma*, já tendo sido encontrado na Europa, Ásia e África. Esta espécie difere do vírus *Thogoto* por apresentar sete segmentos em vez de seis. O vírus *Dhori* apresenta um subtipo, representado pelo vírus Batken, que se limita apenas ao continente Asiático, sendo transmitido quer por carraças do género *Hyalomma* quer por mosquitos. Ao contrário do vírus *Dhori*, que causa infeções sintomáticas em humanos, o vírus Batken apenas demonstra ser patogénico para ratos e galinhas (5,46). Em 2005 o

Introdução

vírus *Araguari* foi proposto como um novo membro do género *Thogotovirus*. Este vírus restringe-se apenas à América do sul, e o seu modo de transmissão ainda permanece desconhecido. Em 2011 foi também descrito o vírus Jos, tendo sido igualmente integrado no género *Thogotovirus*, o qual parece utilizar como vetores as carraças dos géneros *Amblyomma* e *Rhipicephalus*. A sua área de distribuição geográfica limita-se ao continente Africano (41). Dois anos mais tarde, dois novos vírus foram propostos como membros deste género, tendo sido designados como vírus Upolu e Aransas Bay. Ambos usam as carraças do género *Ornithodoros* como vetor e apresentam uma distribuição geográfica limitada (o vírus Upolu limita-se à Austrália e Aransas Bay à América do norte (47)). Caracterizações moleculares identificaram ainda recentemente (em 2015) um novo vírus que veio a ser classificado como um membro adicional do género *Thogotovirus*. O vírus *Bourbon*, identificado em 2014 após causar a morte a um homem no Kansas (EUA), até ao momento ainda só foi identificado na América do norte. O seu presumível vetor indica ser uma carraça, uma vez que já se verificou que este vírus é capaz de replicar em linhas celulares derivadas de carraças do género *Hyalomma*, *Rhipicephalus* e *Amblyomma* (48). Análises filogenéticas indicam que este novo togotovírus, cuja sequência está assinalada pela seta na Figura 3, está mais proximamente relacionado com os vírus *Dhori* e *Batken* (28) .

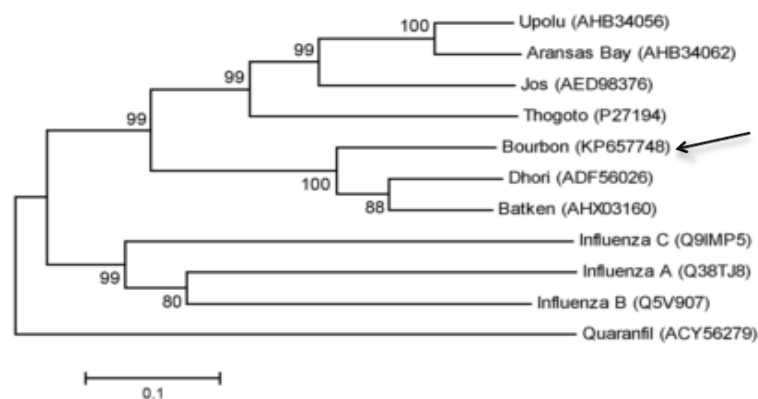


Figura 3 – Relações filogenéticas entre vírus *Orthomixoviridae* inferidas através da análise da sequência de aminoácidos deduzidas para a proteína PA [adaptado de (28)].

Introdução

Até ao momento, apenas os vírus *Thogoto* e *Dhori* viram a sua classificação taxonômica ser confirmada pelo ICTV, sendo que as cinco espécies propostas adicionalmente como membros deste género ainda aguardam aprovação. Este género (incluindo as espécies que aguardam aprovação) inclui, até ao momento, pelo menos três espécies (representadas pelos vírus *Thogoto*, *Dhori* e *Bourbon*) que infetam e causam doença em humanos (41,48).

1.4. O género *Phlebovirus*

O género *Phlebovirus* é um dos cinco géneros (*Orthobunyavirus*, *Hantavirus*, *Nairovirus*, *Phlebovirus* e *Tospovirus*) que incluem a família *Bunyaviridae*, uma das maiores famílias de vírus de RNA, com mais de 350 representantes conhecidos (36). O género *Phlebovirus*, um dos géneros com maior impacto em Saúde Pública (49), é constituído por vírus que apresentam viriões esféricos com 80 a 120 nm de diâmetro, possuindo um invólucro lipídico com glicoproteínas de superfície organizadas numa estrutura icosaédrica. O genoma é constituído por RNA linear de cadeia simples com polaridade negativa, sendo dividido em três segmentos (Figura 4). O segmento L, com cerca de 6,4 kpb, codifica uma polimerase de RNA, a qual é responsável, simultaneamente, pela transcrição e replicação do genoma viral. Por seu lado, o segmento M com 3,2 kpb codifica as glicoproteínas do invólucro, enquanto o segmento S, com 1,7 kpb, codifica a proteína N e uma proteína não estrutural (NSs) (50). Apesar do genoma ter polaridade negativa, o segmento S apresenta uma estratégia de codificação bidirecional, em que a sequência nucleotídica que codifica a proteína NS está contida num gene com polaridade oposta à do gene que codifica a proteína N. Todos os segmentos possuem sequências complementares nas extremidades 5' e 3', as quais podem emparelhar dando origem a estruturas circulares (51).

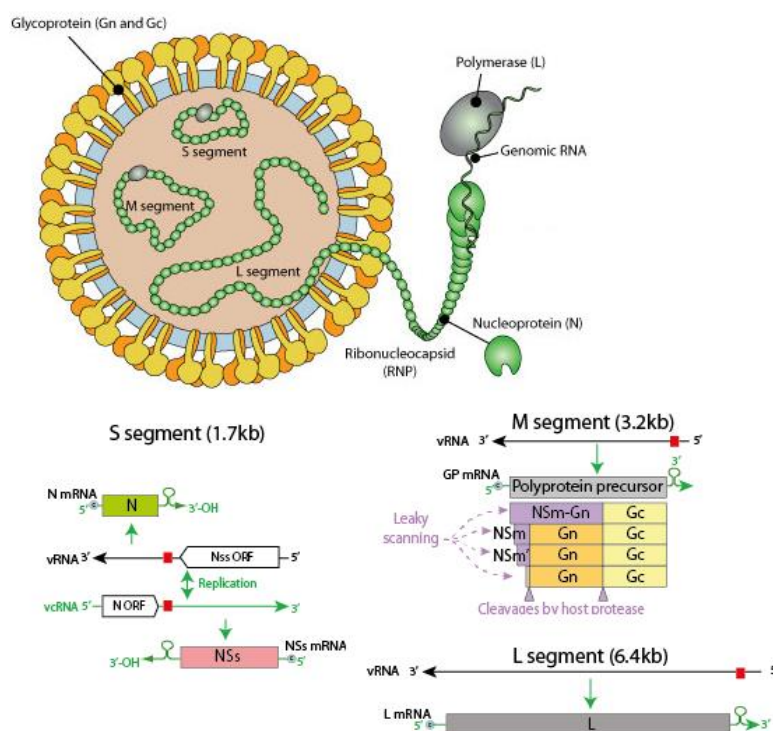


Figura 4 - Representação esquemática dos viriões e da estrutura dos três segmentos (S, M e L) que compõem o genoma dos vírus do gênero *Phlebovirus* [adaptado de (50)].

O gênero *Phlebovirus* integra, até ao presente, mais de 70 vírus compreendidos em 10 grupos de espécies, sendo a espécie tipo representada pelo vírus da febre do vale do Rift. Até há relativamente pouco tempo, este género estava dividido em dois grandes grupos, o grupo *Sandfly fever* e o grupo Uukuniemi, o primeiro incluindo vírus transmitidos por flebótomos e mosquitos, e o segundo por vírus transmitidos por carraças (49). Atualmente, as análises filogenéticas baseadas na análise de sequências virais revelam, pelo menos, quatro grupos genéticos distintos de flebovírus transmitidos por carraças: o grupo Bhanja, o grupo SFTSV, o grupo Uukuniemi, e o grupo Kaisodi (31) (as relações filogenéticas entre os elementos destes grupos podem ser observadas por consulta ao Anexo I).

O protótipo do grupo Uukuniemi é um vírus com o mesmo nome, isolado em 1960 no sul da Finlândia a partir de carraças da espécie *Ix. ricinus*, tendo sido posteriormente identificado em muitos outros países da Europa (5). Dentro deste grupo

Introdução

incluem-se 14 vírus: Uukuniemi-S23, Catch-me-cave, EgAN 1825-61, Fin V707, Manawa, Grand Arbaud, Murre, Oceanside, St. Abbs Head, Ponteves, Precarious Point, RML-105355, Tunis, Zaliv Terpeniya, e adicionalmente dois vírus cuja associação ao grupo é ainda provisória (o vírus Chize e o vírus Sanday Canyon). Ainda que os vírus deste grupo aparentemente não sejam patogénicos para humanos (ou apresentem potencial patogénico limitado), pelo menos um representante do grupo (vírus Uukuniemi) é suspeito de causar doença febril em três pacientes (31,52).

O protótipo do grupo SFTSV é um vírus isolado em 2010 na China. Estudos filogenéticos baseados na análise da sequência genómica dos isolados até hoje obtidos sugeriram representar uma nova linhagem distinta dentro do género *Phlebovirus* (52). Em 2012, um outro vírus patogénico foi descrito, tendo sido designado vírus Heartland. Análises filogenéticas demonstraram estar intimamente relacionado com o SFTSV, inserindo-se assim neste grupo (53). Em 2013, análises filogenéticas baseadas na análise do genoma completo do vírus Malsoor, identificado em 2010 na Índia, indicaram ser um novo membro do grupo SFTSV. Apesar do facto do vírus Malsoor, isolado a partir de morcegos, ter demonstrado ser capaz de infetar diferentes linhas de células de mamíferos em ambiente laboratorial, desconhece-se quer o seu vetor na Natureza, quer a sua capacidade para infetar humanos (54). Um ano mais tarde, a caracterização genética do vírus Hunter Island, identificado em 2002 na Tasmânia (Austrália), revelou que este está relacionado evolutivamente com os vírus SFTSV e Heartland constituindo, assim, parte deste grupo (55) com relativa importância em Saúde Pública dada a elevada patogenicidade para o Homem dos seus dois principais membros (SFTSV e Heartland) (33,53).

O grupo Bhanja, cujo protótipo é um vírus com o mesmo nome, isolado em 1954 na Índia a partir de carraças da espécie *Haemaphysalis intermedia*, inclui adicionalmente o vírus Palma, isolado em 1992 em Portugal a partir de *Ha. punctata* (56). Posteriormente, os vírus Kismayo e o vírus Forecariah, que até recentemente formavam um agrupamento “flutuante” (i.e. não associado a nenhuma linhagem genética em particular dentro do género), foram igualmente incluídos neste grupo de flebovírus. Caracterizações genéticas e análises filogenéticas dos vírus inseridos no

Introdução

grupo Bhanja revelaram tratar-se de um grupo relativamente próximo do grupo SFTSV (56,57). Posteriormente, mais dois vírus da família *Bunyaviridae* (os vírus Lone Star e Razdan) foram integrados neste grupo (58–60). O grupo Bhanja detém importância médica pelo facto de causar doença febril em humanos, com manifestações adicionais que incluem meningoencefalite com fotofobia, conjuntivite, dores de cabeça, vômitos e paresias (disfunção ou interrupção dos movimentos de um ou mais membros) (10). Ainda assim, a potencial virulência dos outros membros do grupo para humanos ou animais ainda não é clara (31).

Um estudo recente propôs a existência de um novo grupo de flebovírus transmitido por carraças, o qual veio a ser designado por Kaisodi. Neste grupo, inicialmente constituído pelos vírus Kaisodi, Lanjan e Silverwater, recentemente veio a ser nele também incluído o vírus Khasan (31).

O género *Phlebovirus* apresenta uma distribuição mundial como apresentado na Figura 5. No entanto, a distribuição geográfica exata de cada vírus do género, é ainda desconhecida (31).

Introdução

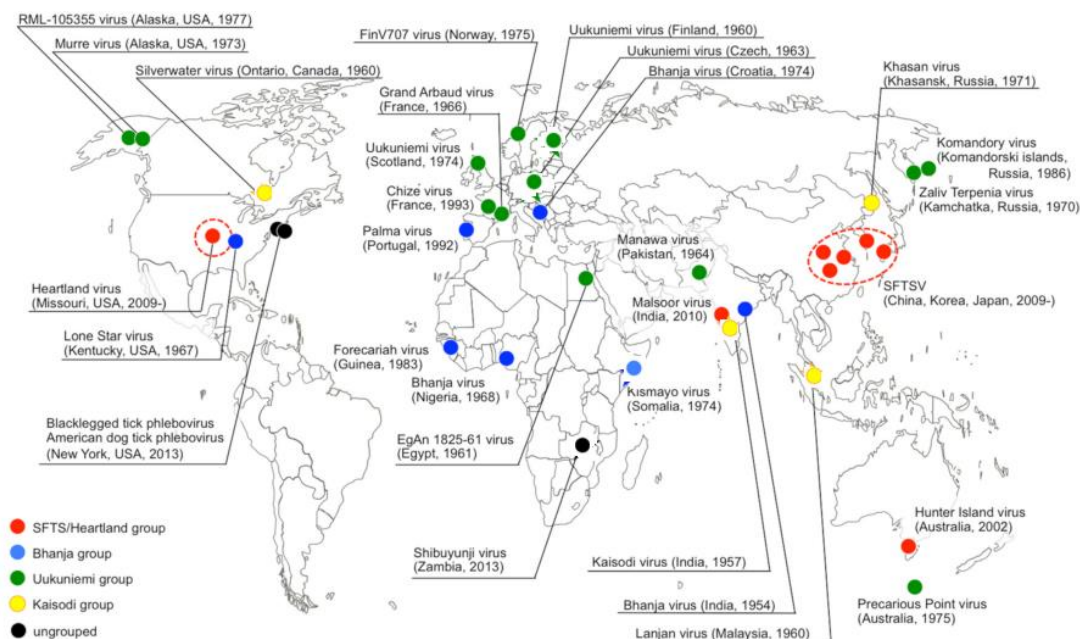


Figura 5 - Mapa representativo de descobertas esporádicas de flebovírus, sendo que os círculos indicam o local onde foram descobertos pela primeira vez [adaptado de (31)].

1.5. Desenvolvimento das técnicas moleculares de amplificação de sequências genômicas virais

A melhoria das tecnologias moleculares que permitam a amplificação e sequenciação de sequências genômicas virais, aliadas a um arsenal de outras ferramentas que podem ser exploradas tendo em vista a identificação e caracterização de novos vírus, tem aberto, e em especial nos últimos anos, novas e estimulantes possibilidades à virologia (15). Inicialmente, a combinação de técnicas como a filtração, microscopia eletrônica, serologia, ensaios de vacinação e propagação de vírus usando culturas celulares foram extensamente utilizadas para a detecção/caracterização de vírus (61). De entre estas técnicas “clássicas”, o isolamento viral em cultura celular, introduzido em 1949 com a propagação do vírus da poliomielite (62), embora invariavelmente lento e potencialmente limitado pelo

Introdução

facto de nem todos conseguirem replicar em cultura, continua a ser amplamente utilizado em combinação com as técnicas de biologia molecular (15,51,61,62).

Um dos avanços técnicos mais importantes e impulsionadores da biologia molecular foi, indubitavelmente, o desenvolvimento da técnica de PCR (do inglês *polymerase chain reaction*) em 1984 por Kary Mullis (63). Precedente a este avanço, já teria sido isolada a polimerase transcriptase-reversa em 1970 (15), o que permitiu adaptações da técnica de PCR na sua abordagem mais convencional, a qual permite, de facto, apenas a amplificação de sequências de DNA, tornando então igualmente possível a amplificação de RNA (RT-PCR; do inglês *reverse transcription PCR*) (63). A partir deste momento, a análise, caracterização, bem como a deteção de novos vírus, tem sido feita essencialmente utilizando protocolos de amplificação de fragmentos do genoma viral, embora a amplificação total dos seus genomas seja, em muitos casos, igualmente possível. Estes protocolos dividem-se em dois grandes tipos, os que permitem amplificações dirigidas e os que permitem amplificações não-dirigidas, ou seja, dependentes ou parcialmente independentes (respetivamente), de um conhecimento *a priori* das sequências virais a amplificar (61).

1.5.1. Amplificações dirigidas

As amplificações dirigidas de genomas virais recaem essencialmente sobre a técnica de PCR, que através de passos cíclicos de alternância de aquecimento e arrefecimento, incluem a desnaturação do DNA em cadeias simples e hibridação dos *primers* (oligonucleótidos iniciadores da reação de polimerase) aos seus alvos complementares, seguida da sua extensão por uma polimerase de DNA termo-estável. Esta técnica permite, então, a amplificação exponencial das regiões de um qualquer genoma limitadas pelos *primers* utilizados (64). Para além da PCR convencional, inúmeros métodos baseados neste são amplamente utilizados, como são destes exemplos as técnicas de RT-PCR, (*hemi*)*nested*-PCR, *multiplex*-PCR e

Introdução

PCR em tempo real. Apesar de terem uma elevada especificidade e sensibilidade, estes métodos revelam algumas limitações na pesquisa de novos vírus. Uma vez que as amplificações pretendidas dependem da hibridação de *primers* a um alvo ao qual são complementares, é necessário conhecer previamente as sequências virais a amplificar, pelo menos de forma parcial. Tal facto, só por si, impede que vírus geneticamente divergentes ou nunca até então descritos possam vir a ser detetados nas abordagens mais convencionais, as quais fazem uso de *primers* específicos. Numa tentativa de contornar estas limitações, tem sido amplamente explorada a possibilidade de degeneração da sequência dos *primers* que limitam, ainda assim, regiões genómicas conservadas dentro dos grupos virais, de forma a permitir que uma maior diversidade genética de vírus possa ser detetada (62). No entanto, o aumento da degeneração dos *primers* utilizados conduz a um aumento da complexidade da mistura de reação, a qual é consequentemente acompanhada por uma diminuição da sua especificidade e sensibilidade, sendo normalmente o limite máximo de degenerescência cerca de 256 (65). Uma forma de diminuir esta complexidade é a utilização da síntese de *primers* de nucleótidos com resíduos de Inosina, que consiste numa base capaz de emparelhar com qualquer nucleótido, substituindo assim a degeneração máxima (traduzida sob a forma de I na sequência de um primer). Ainda assim, há que ter em conta que a Inosina não hibrida com igual afinidade com todos os nucleótidos (66), sendo C>A>T~G.

À semelhança destas abordagens de amplificação dirigida, a utilização de microarranjos (*microarrays*) pode ser utilizada na descoberta de novos vírus e/ou na sua caracterização. Todavia, por exigir uma hibridação específica entre um genoma viral e alvos (*primers*) imobilizados numa superfície sólida, são severamente limitadas na descoberta de vírus altamente divergentes dos conhecidos até a data. (62).

1.5.2. Amplificações não-dirigidas

Ao contrário das amplificações dirigidas, as abordagens de amplificação não-dirigidas à sequência que se pretende analisar cobrem, de forma mais ampla, a detecção de novos vírus, pelo facto de não exigirem um conhecimento prévio das sequências virais a detetar. Por esta razão, estas estratégias alternativas são frequentemente utilizadas para a descoberta de novos vírus, e suportam parcialmente o desenvolvimento da metagenómica (61,62,65).

Existem inúmeras abordagens baseadas em amplificações não-dirigidas, sendo os métodos de hibridação subtrativa uma delas. Um exemplo deste método é a técnica RDA (do inglês *Representational difference analysis*), que combina a hibridação subtrativa com a amplificação de um alvo genético limitado por adaptadores sintéticos de sequência conhecida, de forma a detetar diferenças entre duas amostras semelhantes (67). As amostras “*tester*”, contendo as sequências virais, e as amostras “*driver*” (desprovida de vírus), são hibridadas em conjunto de modo a reduzir as sequências comuns entre ambas (65). As diferenças entre elas são ampliadas através de amplificações que fazem uso de *primers* que não são dirigidos às sequências que se pretendem caracterizar, mas sim aos adaptadores sintéticos que a elas foram inicialmente ligados. Esta técnica impõe à partida limitações pelo facto de exigir grandes quantidades de material infetado e não infetado do mesmo indivíduo (68). Adicionalmente, têm ainda a desvantagem de não ter sensibilidade suficiente para detetar vírus quando a carga viral é baixa ou quando a sequência viral não se distingue claramente da amostra controlo (61).

A técnica SISPA (do inglês *Sequence-Independent Single Primer Amplification*) contorna as limitações da técnica anteriormente mencionada (61), tendo como vantagens a sua simplicidade e velocidade, aliadas ao facto de não introduzir viés na identificação de grupos específicos de vírus (65). Esta técnica foi inicialmente descrita por Reyes em 1991 (69), porém tem vindo a ser desenvolvida e adaptada de modo a permitir a detecção de vírus de genoma de RNA ou DNA com elevada sensibilidade (61). A detecção pela técnica SISPA precede um passo de enriquecimento viral da amostra que

Introdução

inclui a combinação dos métodos de filtração, deposição das partículas virais por ultracentrifugação e sua (eventual) purificação através da utilização de gradiente de densidade, e digestão enzimática de ácidos nucleicos não-encapsidados (não-virais) usando DNase e RNase (65).

No caso dos genomas virais de RNA (a representação esquemática desta técnica pode ser observada na Figura 6), as sequências virais são convertidas em cDNA utilizando *primers* com uma sequência definida, associada a uma região de sequência aleatória compreendendo de 6-8 posições nucleotídicas totalmente degeneradas no extremo 3' (ex: 5' GCCGGAGCTCTGCAGATATC NNNNNN 3') ou em que o extremo 3' traduz uma região com múltiplos (18-20) nucleótidos de desoxitimidina (ex: 5' GCCGGAGCTCTGCAGATATC(T)₂₀ 3'), permitindo uma hibridação destes *primers* a RNAs caudas de poly-A. A segunda cadeia de DNA é sintetizada mediante a utilização de uma polimerase parcialmente desprovida de atividade exonucleásica na presença dos *primers* anteriormente mencionados. A dupla cadeia de DNA é posteriormente amplificada por PCR utilizando um *primer* complementar à região constante definida dos *primers* utilizados (ex: 5' GCCGGAGCTCTGCAGATATC 3') (70). Frequentemente a SISPA permite identificar genomas virais desconhecidos presentes numa qualquer amostra biológica em quantidades relativamente limitadas (67). No entanto, a sua *performance* pode ser comprometida na presença de ácidos nucleicos contaminantes (ambientais ou provenientes das células hospedeiras infetadas), dado que todas as moléculas de DNA podem ser simultaneamente amplificadas, podendo assim dificultar a identificação das sequências virais (65). Tal facto deverá ser tido especialmente em conta caso os ácidos nucleicos contaminantes (não-virais) sejam muito abundantes. Existem ainda outras variações e adaptações de SISPA, como é o caso da técnica de VIDISCA (do inglês *Virus Discovery cDNA-AFLP*) que se baseia nos mesmos princípios de SISPA, mas que combina a utilização de dois pares de *primers* (em vez de um), a uma *nested-PCR*, tornando as amplificações pretendidas mais específicas e sensíveis (67). Para além destas, outras técnicas de amplificação não-dirigida como são os casos de rPCR (do inglês *random PCR*) e RCA (do inglês *Rolling Circle Amplification*) têm sido amplamente utilizadas na deteção de novos vírus (65). Como principal desvantagem aponta-se o facto de estas abordagens favorecerem as

Introdução

sequências virais maioritárias presentes numa amostra, o que dificulta a identificação de sequências virais que possam estar presentes em baixa quantidade.

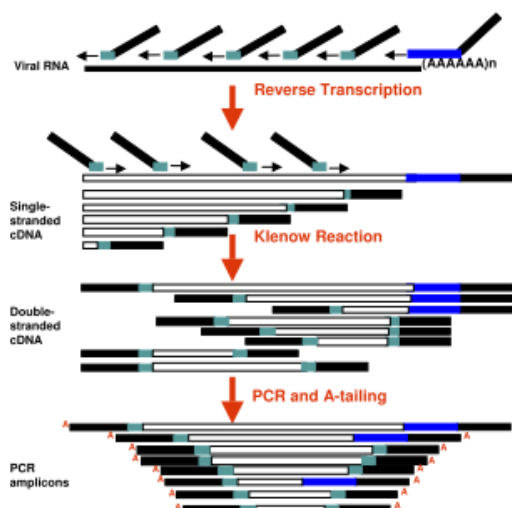


Figura 6 - Representação esquemática da técnica SISPA. As descrições técnicas estão referidas no texto acima [adaptado de (70)].

As dificuldades encontradas, até há cerca de uma década atrás, no que diz respeito à descoberta/caracterização de novos vírus usando umas das diferentes abordagens acima descritas podem, hoje em dia, ser parcialmente obviadas através da combinação das primeiras às tecnologias genericamente conhecidas como NGS (do inglês *Next Generation Sequencing*). No seu conjunto, estas traduzem metodologias de sequenciação de alto rendimento, que geram milhões de sequências simultaneamente a partir de uma amostra (71). Existem muitas plataformas disponíveis e o seu desenvolvimento combina vários fatores responsáveis pelo sucesso notório destas tecnologias (nomeadamente velocidade, automatização, alto rendimento, e precisão (61)), e que têm permitido determinar facilmente os genomas de novos vírus (31).

A virologia entrou numa era onde é possível, condicionalmente, identificar centenas ou provavelmente milhares de novos vírus (15). Durante os últimos anos, tem-se assistido à emergência da metagenômica como uma nova ferramenta poderosa com extensa aplicação em virologia, devendo-se sobretudo ao advento das NGS (61,71). No

Introdução

entanto, mesmo quando estas abordagens (metagenómica baseada na utilização de NGS) não podem ser executadas por constrangimentos financeiros, técnicos, logísticos ou computacionais, a identificação de um qualquer vírus numa amostra biológica, sendo ele conhecido ou totalmente novo, pode ser feita explorando algumas das abordagens anteriormente descritas ao longo desta secção. Uma vez que vários estudos sugerem que o domínio da virologia explorou menos de 1% da diversidade viral existente (61), e sendo os vírus as entidades biológicas mais ubíquas e abundantes na Terra (72), existe ainda muito por explorar.

1.6. Objetivos

As carraças são o segundo vetor com maior importância em Saúde Pública, tendo sido já comprovada a capacidade de inúmeras espécies destes artrópodes transmitirem uma grande variedade de vírus com genoma RNA a uma vasta gama de hospedeiros vertebrados. Devido à recente deteção a nível mundial de uma série de potenciais novos vírus desconhecidos em diversas espécies de carraças, aliada à enorme limitação no conhecimento relativo à distribuição de vírus transmitidos por carraças em Portugal, tornou-se relevante aprofundar este tema. Assim, constituíram objetivos da presente dissertação, a caracterização preliminar de vírus de carraças colhidas em Portugal, utilizando duas abordagens essencialmente distintas que fizeram uso de amplificações dirigidas e não-dirigidas de sequências genómicas virais.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Caracterização da população de ixodídeos em estudo

As carraças incluídas neste estudo foram gentilmente classificadas pela Mestre Mónica Nunes, tendo sido recolhidas da vegetação entre os dias 9 de maio e 26 de junho de 2015 (Ricardo Parreira e Mónica Nunes, comunicação pessoal). As colheitas de ixodídeos foram efetuadas nos distritos de Setúbal e Lisboa, nomeadamente na Herdade da Ribeira Abaixo (perto de Grândola), e EVOA (Espaço de Visitação e Observação de Aves na Reserva Natural do Estuário do Tejo), e nas povoações da Comporta, Carrasqueira e Alcácer do Sal (localização assinalada no mapa da Figura 7). De um universo de 2753 carraças recolhidas, apenas foram incluídas no estudo 730 espécimes adultos do sexo feminino, nas quais estão representadas as seguintes espécies: *Rhipicephalus sanguineus* (45%), *Rhipicephalus bursa* (45%), *Dermacentor marginatus* (9%) e *Hyalomma marginatum* (1%). Adicionalmente, vieram ainda a ser incluídas neste estudo 64 carraças adultas do sexo masculino, provenientes de colheitas efetuadas no EVOA, incluindo 32 *Rh. bursa* e 32 *Rh. sanguineus*. Os pontos de recolha podem ser observados no mapa da Figura 7.

Material e Métodos

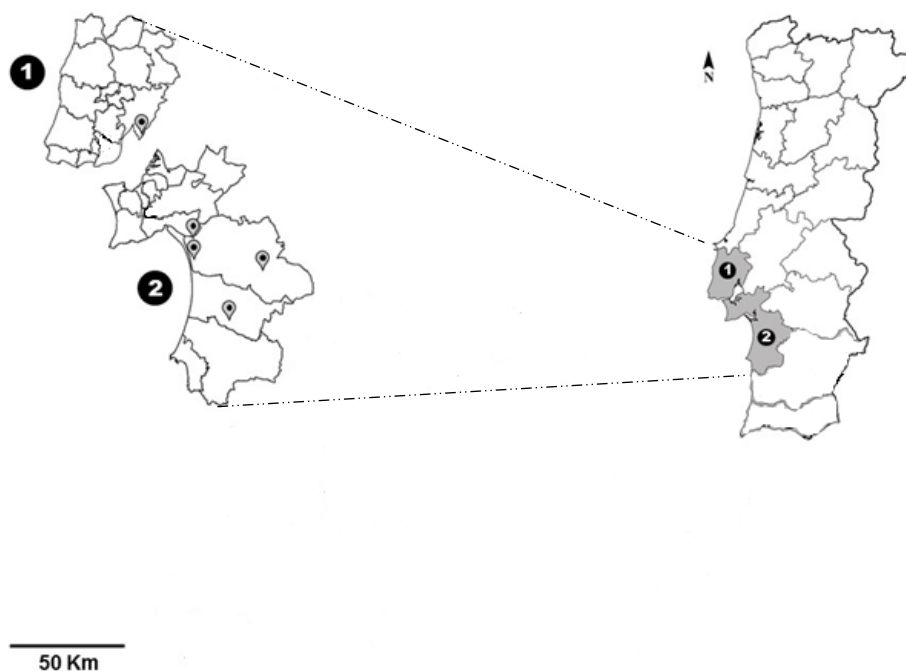


Figura 7- Mapa representativo dos cinco pontos de recolha dos ixodídeos em estudo, sendo que as regiões a cinzento (1 e 2) indicam os distritos de Lisboa e Setúbal.

2.2. Recolha e conservação dos ixodídeos coletados

A técnica utilizada para a recolha de carraças da vegetação foi a técnica de arrastamento da bandeira, conhecido como *flagging*. As carraças foram temporariamente conservadas em tubos de plástico com uma folha verde (manutenção da humidade) e pequenos furos na tampa, para que deste modo fosse possível mantê-las vivas durante o seu transporte até ao laboratório (IHMT). Após a identificação dos espécimes colhidos, a qual foi efetuada pela sua observação num estereomicroscópio e na análise de caracteres morfológicos, foram separadas consoante a espécie, sexo e estágio de desenvolvimento (formas imaturas vs. adultos) em tubos Eppendorf® de 1,5 ml e congeladas a -80°C, até uso posterior.

2.3. Maceração das carraças

As carraças foram lavadas com etanol a 70% no tubo Eppendorf® de 1,5 ml no qual tinham sido previamente congeladas. Posteriormente, foram divididas em *pools*, nos quais foram incluídas um máximo 10 carraças adultas do sexo feminino, separadas por espécie, região e data de recolha. Os 4 *pools* de espécimes machos, adicionados posteriormente ao estudo, incluíram 16 carraças cada um. Cada *pool* foi acondicionado em tubos Eppendorf® de 1,5 ml contendo 250µl de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) e albumina bovina (fração V, NZYtech) a 4%, onde se procedeu manualmente à maceração dos mesmos com recurso de uma ponta de uma micropipeta. Após a maceração ter terminado, foi adicionado a cada tubo 200µl de PBS com albumina a 4%, tendo os tubos sido sujeitos a uma centrifugação de 10 minutos a 4°C e 11.000 g. A totalidade do volume do sobrenadante (aproximadamente 400µl) foi recolhida e dividida em dois tubos Eppendorf® de 1,5 ml, um destinado à extração de RNA, o outro para eventual isolamento de vírus em linhas celulares mantidas em cultura. Os tubos, contendo a fração líquida do macerado, foram armazenados a -80°C até uso posterior. Os dados relativos aos macerados podem ser observados no Anexo II.

2.4. Extração de RNA total a partir do sobrenadante de macerados de carraças

A extração de RNA a partir de macerados de carraças foi realizada com recurso ao *NZYol* (NZYtech). Antecedente a esta, foi adicionado a cada macerado 20µl de tampão de DNase e 50 unidades de DNase I (5µl), e as misturas incubadas duas horas a 37°C, de modo a remover a maior parte do DNA contaminante (não-encapsidado). O

Material e Métodos

NZYol consiste numa solução monofásica de compostos de tiocianato e fenol que atuam rompendo as células e as partículas virais sem que o RNA seja degradado. A cada 200µl de sobrenadante do macerado foi adicionado 600µl de *NZYol*, sucedendo-se uma agitação de 2 minutos até se observar a formação de uma emulsão completa, seguida de incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi adicionado 150µl de clorofórmio à mistura, a qual foi agitada e incubada 3 minutos à temperatura ambiente, seguindo-se a sua centrifugação a 11.000 g, durante 15 minutos, a 4°C. A adição de clorofórmio separa a mistura numa fase aquosa (onde está presente o RNA) e numa fase orgânica. Foi, portanto, recolhida a fase aquosa, à qual se adicionou 1µl de glicogénio que funciona como um *carrier* de RNA na precipitação, a qual ocorreu mediante a adição de 500µl de isopropanol puro. Os tubos foram mantidos à temperatura ambiente durante 15 minutos e em seguida centrifugados 30 minutos (11.000 g a 4°C). O sobrenadante foi eliminado e o sedimento lavado com 600µl de etanol a 70% (que retira os sais e outras impurezas hidrossolúveis que possam possivelmente ainda estar associadas ao RNA). Os tubos foram agitados em vórtex e centrifugados a 11.000 g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi novamente eliminado e o sedimento seco sob vácuo a 45°C (Concentrator 5301-Eppendorf). Por último, o sedimento foi ressuspenso em 30µl de água livre de nucleases. O RNA extraído foi depois quantificado usando um Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific).

2.5. Síntese de DNA complementar (cDNA) por transcrição reversa (RT-PCR) a partir de RNA total

A síntese de DNA complementar (cDNA) a partir de RNA total extraído do sobrenadante de macerados de carraças foi efetuada utilizando o sistema comercial *RevertAidTM H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Fisher Scientific). Na preparação das reações de transcrição reversa (RT), o volume do extrato total de RNA utilizado variou consoante a concentração RNA total em cada extrato. O objetivo final

Material e Métodos

consistiu na utilização de um volume de extrato de RNA de tal forma que, um volume máximo de 11µl, viesse a conter, aproximadamente, 1000ng de RNA. As diferentes reações de RT foram, então, preparadas com uma quantidade variável de extrato de RNA total, ao qual foi adicionado 1µl de solução contendo hexâmeros aleatórios (*primers* de sequência aleatória), perfazendo um total de 12µl adicionando água tratada com DEPC (dietil-piromcarbonato). Como as moléculas de RNA permanecem estruturadas sobre elas próprias, para facilitar a hibridação dos *primers* com as suas sequências complementares, as misturas de reação foram submetidas a um tratamento a 65°C durante 5 minutos, de forma a desnaturar as moléculas de RNA e, a partir deste, remover um máximo de regiões com estruturas secundárias. De seguida, os tubos foram mantidos num banho de gelo durante 5 minutos. Posteriormente, foi adicionado a cada mistura de reação 8µl de uma mistura cuja composição incluiu 4µl de tampão de reação (concentrado 5X), 1µl de inibidor de RNases (*RiboLockTM RNase Inhibitor*), 2µl de uma mistura de dNTPs concentrados a 10mM e 1µl de transcriptase reversa (*RevertAidTM H Minus M-MuLV*). As misturas de reação foram agitadas suavemente e colocadas num termociclador PCR EXPRESS (Hybaid), em que o perfil térmico programado incluiu um passo de hibridação a 25°C durante 5 minutos, extensão dos *primers* hibridados a 42°C durante 60 minutos e inativação da transcriptase-reversa a 70°C durante 5 minutos.

Por uma questão de tempo e otimização dos recursos financeiros, optou-se por seguir o estudo apenas com uma representação da população inicial. A seleção inicial das amostras a analisar seguiu os seguintes critérios: seleção imediata dos casos únicos (ex: quando apenas havia disponível 1 *pool* de carraças de uma qualquer espécie, colhidas numa qualquer região); exclusão *a priori* de todos casos em que o limite máximo de volume de extrato a utilizar na reação de RT (11µl) não contivesse 1000ng de RNA (ou próximo deste valor). Por entre os restantes casos, foram seleccionados *pools* de forma aleatória. Porém, no decurso do estudo, quando verificado que era possível obter produtos de amplificação de alguns de extratos correspondendo a casos únicos em que a concentração de RNA impedia a obtenção de 1000ng/11µl, optou-se por incluir mais seis extratos no estudo, de forma a aumentar o número de sequências virais amplificadas de *Rh. bursa* de EVOA (ver secções seguintes).

2.6. Delineamento dos primers e hidratação dos mesmos

O delineamento dos *primers*, que no decurso deste trabalho foram especificamente delineados para virem a ser utilizados em reações de amplificação dirigidas à deteção de vírus dos géneros *Phlebovirus* e *Thogotovirus*, foi efetuado com base em alinhamentos múltiplos de sequências nucleotídicas dos diferentes genomas virais (foram alinhadas as sequências de segmentos virais homólogos) de vírus destes dois géneros. Estes alinhamentos foram realizados recorrendo a um *software* informático disponível online, MAFFT versão 7 (73), e construídos com base na análise de sequências virais de membros de cada género viral disponíveis no GenBank. De modo a abranger a maior diversidade genética possível (dentro de cada género), o conjunto de *primers* desenhados foram degenerados. O delineamento foi direcionado para as regiões mais conservadas quando os genomas virais foram alinhados entre si, tendo em atenção que estes *primers* não hibridassem consigo próprios. O tamanho dos *primers* variou entre 20 a 29 nucleótidos, e as respetivas temperaturas de desnaturação (*melting*) calculadas com recurso à ferramenta *TM Calculator* (disponível em www.thermofisher.com), usando como opção de amplificação uma polimerase de DNA de tipo *Taq*. Os conjuntos de *primers* delineados podem ser observados na Tabela 1.

Os *primers* foram sintetizados pela empresa STABVIDA (Portugal). De modo a facilitar o transporte e também por uma questão de garantia da sua estabilidade, estes são obtidos comercialmente sob a forma de resíduo seco, pelo que é necessário hidratá-los. Os *primers* foram hidratados com H₂O para obter uma solução numa concentração de 100pmol/μl. As soluções de trabalho foram usadas numa concentração de 10pmol/μl.

Material e Métodos

Designação dos primers	SEQUÊNCIA (5' 3')	TM (°C)	TAMANHO (NT)
Thogoto_F1	GGATYTGGAAGATBCAYMGRGAYC	59.7	24
Thogoto_R1	CBTGHTAKGARACHCCYTBTGCCTC	62.8	25
Thogoto_R2	TCRTCCATCCAYCCGATBAGCAC	62.5	23
PhlebAll_F1	CARCAYGGDGGIBWIAGRAT	58.6	23
PhlebAll_R1	GADGTIHRRTGIARDATICCYTGCATCAT	58.2	29
Bhanj_F2	GAGGCTGTYGGKCAYGARACC	63.1	21
SFTSV_F2	GAGCTDAGCCCWCAYGARAC	58.5	20
UukcPhle_F2	GATGATGCHVIMRTGGAAYCA	57.3	22

Tabela 1 - Primers delineados no decurso deste trabalho, de forma a poderem ser utilizados nas reações de amplificação de sequências genómicas virais de vírus dos géneros *Thogotovirus* e *Phlebovirus*.

2.7. Amplificação de sequências genómicas de *Thogotovirus* e *Phlebovirus* por *heminested-PCR*

Para detetar a presença de sequências genómicas de *Thogotovirus* e *Phlebovirus* foi utilizada a técnica de amplificação por *heminested-PCR*. Esta técnica envolve a realização de duas reações de amplificação consecutivas, sendo que numa primeira fase são utilizados dois *primers* (designados de externos), de forma a obter um produto de amplificação que serve de matriz para a reação seguinte. Na segunda reação, um dos *primers* externos é mantido, sendo necessária a utilização de um *primer* adicional (designado de interno). O produto de amplificação originado nesta segunda fase de amplificação é, consequentemente, um fragmento de tamanho inferior ao primeiro. A vantagem de aplicar esta técnica de dupla reação encadeada prende-se com o facto de

Material e Métodos

esta ser uma das variantes dos protocolos de amplificação que permitem aumentar tanto a sensibilidade como especificidade das amplificações pretendidas.

2.7.1. Amplificação de sequências genômicas de *Thogotovirus*

As amostras (macerados de carraças) foram rastreadas para a presença de genomas de *Thogotovirus* pela técnica descrita em 2.7, utilizando os *primers* Thogoto_F1 e Thogoto_R1 como *primers* externos e Thogoto_R2 como *primer* interno. As misturas de reação foram preparadas numa câmara de fluxo laminar. Para a primeira reação de PCR foram preparadas misturas de reação em tubos Eppendorf® de 1,5 ml contendo, por cada amostra que se pretendesse vir a analisar, 15µl de *NZYTaq 2x Green Master Mix*, 5µl do *primer* Thogoto_F1 e 5µl do *primer* Thogoto_R1 (i.e. 50pmol de cada *primer*). O volume final desta mistura de reação foi posteriormente dividido em alíquotas de 25 µl usando tubos de 0,5 ml, aos quais foram adicionados 5µl de cDNA (preparado como descrito em 2.5), perfazendo um volume total de 30µl. Para a segunda reação de amplificação o procedimento de preparação das misturas de reação foi idêntico ao acima descrito; no entanto os *primers* utilizados foram Thogoto_F1 e Thogoto_R2. As segundas reações de amplificação foram iniciadas por adição às misturas de reação de 5µl do produto da primeira reação de PCR. Os controlos negativos corresponderam a reações em que o volume de ácidos nucleicos foi substituído por H₂O.

As duas reações de amplificação decorreram num termociclador PCR EXPRESS, utilizando um protocolo de base que incluiu um passo inicial de desnaturação a 95°C durante 3 minutos, seguindo-se 40 ciclos com uma etapa de desnaturação a 95°C (30 segundos), uma etapa de hibridação a 55°C (1 minuto), e uma etapa de extensão dos *primers* hibridados a 72°C (45 segundos). Por fim, foi efetuado um passo de extensão final de 72°C (5 minutos), após o que as reações foram mantidas a 4°C. Os fragmentos a amplificar na primeira e segunda reação correspondiam a fragmentos de DNA com aproximadamente 660 e 600 nucleótidos, respetivamente. Os

Material e Métodos

produtos resultantes da amplificação das segundas reações foram analisados por eletroforese em gel de agarose (descrito em 2.11).

2.7.2. Amplificação de sequências genômicas de *Phlebovirus*

As amostras analisadas foram rastreadas para a presença de genomas de *Phlebovirus* pela técnica descrita em 2.7, utilizando os *primers* PhlebAll_F1 e PhlebAll_R1 como *primers* externos e Bhanj_F2, SFTSV_F2 e UukcPhle_F2 como *primers* internos. As primeiras misturas de reação foram preparadas como descrito em 2.7.1, contudo os *primers* externos utilizados neste caso foram PhlebAll_F1 e PhlebAll_R1. No rastreio de flebovírus, por cada reação de PCR inicial foram realizadas três segundas reações, tendo cada uma como *primer* interno Bhanj_F2, ou SFTSV_F2, ou UukcPhle_F2. O procedimento utilizado foi, essencialmente, o mesmo descrito em 2.7.1, com as alterações apresentadas de forma sumarizada na Tabela 2. Os controlos negativos corresponderam a reações em que o volume de ácidos nucleicos foi substituído por H₂O.

Bhanj	SFTSV	UukcPhle
15µl de 2X PCR Master MIX	15µl de 2X PCR Master MIX	15µl de 2X PCR Master MIX
5µl de PhlebAll_R1	5µl de PhlebAll_R1	5µl de PhlebAll_R1
3µl de Bhanj_F2	3µl de SFTSV_F2	5µl de UukcPhle_F2
2 µl de H ₂ O	2 µl de H ₂ O	
5 µl do produto da primeira reação de PCR	5 µl do produto da primeira reação de PCR	5 µl do produto da primeira reação de PCR

Tabela 2 - Composição e volumes utilizados em cada uma das três segundas reações de PCR (segundo ciclo de amplificações), no rastreio de *Phlebovirus*.

Material e Métodos

As amplificações pretendidas ocorreram num volume total de 30µl num termociclador PCR EXPRESS, sob um protocolo de amplificação que consistiu num passo inicial de desnaturação a 95°C durante 3 minutos, seguindo-se 40 ciclos incluindo uma etapa de desnaturação a 95°C (30 segundos), uma etapa de hibridação a 53°C na primeira reação e 50°C na segunda reação (2 minutos), e uma etapa de extensão de 72°C (45 segundos). Por fim, foi efetuada uma extensão final de 72°C (5 minutos), finda a qual as reações de amplificação foram mantidas a 4°C. Os fragmentos a amplificar na primeira e segunda reação correspondiam a fragmentos de DNA com aproximadamente 450 (Bhanj e SFTSV) ou 315 (UukcPhle) nucleótidos. Os produtos resultantes dos segundos ciclos de amplificações efetuadas foram analisados por eletroforese em gel de agarose (descrito em 2.11)

2.8. Amplificação de sequências genômicas de CCHFV por nested-PCR

Por uma questão de segurança, todos os *pools* correspondentes a carraças da espécie *Hyalomma marginatum* foram rastreados para a presença de genomas de CCHFV por *nested*-PCR, por esta espécie representar o principal vetor deste vírus. Os macerados em questão foram preparados num laboratório BSL3. A técnica de amplificação utilizada, à semelhança da descrita em 2.7, baseou-se numa dupla reação em que o produto da primeira serviu de matriz para a segunda. No entanto, no caso do *nested*-PCR são necessários dois *primers* externos para a primeira reação, e dois *primers* internos para a segunda. Os *primers* utilizados, complementares a sequências do segmento S do genoma viral de CCHFV (Ricardo Parreira comunicação pessoal), podem ser observados na Tabela 3.

As misturas de reação foram preparadas numa câmara de fluxo laminar e seguiram um protocolo semelhante ao descrito em 2.7.1. Num tubo Eppendorf® de 1,5 ml foi preparada uma mistura de reação contendo (por cada amostra a analisar) 15µl de

Material e Métodos

NZYTaq 2x Green Master Mix, 5µl do *primer* CCHFVsf1 e 5µl do *primer* CCHFVsr1. O volume total desta mistura foi posteriormente dividido em alíquotas de 25 µl usando tubos de 0,5 ml, e adicionado 5µl de cDNA (preparado como descrito em 2.5), perfazendo um volume total de 30µl. Para a segunda reação o procedimento utilizado foi semelhante, sendo que CCHFVsf2 e CCHFVsr2 foram utilizados como *primers* internos, e as reações foram iniciadas pela adição de 5µl do produto da primeira reação, perfazendo um volume de 30µl. No caso dos controlos negativos foram adicionados 5µl de H₂O em substituição do respetivo volume de ácidos nucleicos.

Designação dos primers	SEQUÊNCIA (5' 3')	TM (°C)	Coordenadas*
CCHFVsf1	TGGTGYAGGGARTTTGTCAAAGG	59.0	(440-462)
CCHFVsf2	GCAACAGGYCTTGCCAARCTTGCAGA	66.4	(536-561)
CCHFVsr2	GCRGGRTGCATGTARATYCTGTT	59.2	(953-975)
CCHFVsr1	CCAAAGCAAACWCCCATYTCCT	58.3	(1020-998)

Tabela 3 - Sequências nucleotídicas dos *primers* utilizados na deteção de genoma de CCHFV por *nested*-PCR. As temperaturas de desnaturação (TM) foram calculadas com recurso à ferramenta *TM Calculator*, tal como descrito no texto. As coordenadas indicadas correspondem às posições relativas das sequências dos *primers* na sequência de referência depositada no GenBank com o número de acesso KF595138.

As duas reações de amplificação decorreram num termociclador PCR EXPRESS, sob um protocolo de amplificação que consistiu num passo inicial de desnaturação a 94°C (2 minutos), seguindo-se 40 ciclos com uma etapa de desnaturação a 94°C (30 segundos), uma etapa de hibridação a 53°C na primeira reação e 51°C na segunda reação (30 segundos), e uma etapa de extensão de 72°C (45 segundos). Por fim, foi efetuado um passo de extensão final de 72°C (5 minutos). Os tubos foram mantidos, de seguida, a 4°C. Os fragmentos a amplificar na primeira e segunda reação deveriam apresentar tamanhos aproximados de 580 e 440 nucleótidos, respetivamente. As reações

Material e Métodos

de amplificação foram analisadas através da separação por eletroforese em gel de agarose dos produtos eventualmente amplificados (descrito em 2.11).

2.9. Amplificação de sequências genômicas de *Phlebovirus* por multiplex-PCR

Com base em resultados obtidos por um nosso colaborador durante a fase final do rastreio inicialmente planejado, optou-se por repetir o rastreio efetuado utilizando *primers* previamente descritos por Matsuno e colaboradores (31). A abordagem utilizada faz uso de dois pares de *primers* (designados ppL1 e ppL2) que suportam a amplificação parcial do gene da polimerase viral (segmento L) de todas as linhagens genéticas de *Phlebovirus* conhecidas até à data, utilizando duas reações de PCR em paralelo para cada amostra.

Pares de primes	Primers	Sequências 5' – 3'
ppL1	TBPVL2759F	CAGCATGGIGGICTIAGAGAGAT
	TBPVL3267R	TGIAGIATSCCYTGCATCAT
ppL2	HRT-GL2759F	CAGCATGGIGGIYTIAGRGAAATYTATGT
	HRT-GL3276R	GAWGTRWARTGCAGGATICCYTGCATCAT

Tabela 4 - Sequências e designações dos *primers* descritos por Matsuno et al. (31) e utilizados na amplificação de sequências genômicas de *Phlebovirus* por multiplex-PCR.

Material e Métodos

Utilizando esses dois pares de *primers* (Tabela 4), os genomas de flebovírus foram detetados usando uma modificação do protocolo proposto, e que consistiu na execução de um ensaio de tipo *multiplex*-PCR, em que ambos os dois pares de *primers* foram utilizados em cada reação de PCR. As misturas de reação foram preparadas numa câmara de fluxo laminar, usando tubos Eppendorf® de 1,5 ml contendo (por cada amostra a analisar) 15µl de *NZYTaq 2x Green Master Mix*, 1µl de cada um dos *primers* (diluídos, como acima indicado, a 10pmol/µl) e 6µl de H₂O. O volume total desta mistura de reação foi dividido em alíquotas de 25µl usando tubos de 0,5ml, e adicionado a cada um 5µl de cDNA (preparado como descrito em 2.5), ou 5 µl de H₂O no caso dos controlos negativos, perfazendo um volume total de 30µl. As reações de amplificação decorreram num termociclador PCR EXPRESS, tendo sido utilizado um perfil térmico que consistiu num passo inicial de desnaturação a 94°C (2 minutos), seguindo-se 40 ciclos envolvendo uma etapa de desnaturação a 94°C (30 segundos), uma etapa de hibridação a 55°C (1 minuto e 30 segundos), e uma etapa de extensão de 72°C (45 segundos). Por fim, foi efetuado um passo de extensão final de 72°C (5 minutos) tendo, de seguida, as reações sido mantidas a 4°C. Os fragmentos a amplificar na primeira e segunda reação correspondiam a moléculas com aproximadamente 500 nucleótidos. Os produtos resultantes da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (descrito em 2.11). A purificação e sequenciação de alguns dos produtos de amplificação obtidos foram asseguradas por uma empresa de biotecnologia (STABVIDA, Portugal), como serviço externo.

2.10. PCR em tempo real dirigido para o RNA 18S de ixodídeos

A deteção de sequências correspondentes ao RNA da sub-unidade ribossomal pequena (18S rRNA) de carraças de corpo duro foi efetuada por recurso à técnica de PCR em tempo real. Esta técnica permite uma deteção/quantificação de ácidos nucleicos numa mistura com base na medição da intensidade da fluorescência que é

Material e Métodos

emitida, em tempo real, no decurso do processo de amplificação. A sonda utilizada foi uma sonda de tipo *TaqMan* (Figura 8), a qual se encontrava marcada numa extremidade com um fluoróforo (F) e na outra um *quencher* (Q), que anula a energia do fluoróforo quando perto deste, mas não quando estes são separados fisicamente no momento em que a sonda é degradada como resultado da atividade exonucleásica 5'-3' da polimerase de DNA utilizada na amplificação pretendida.

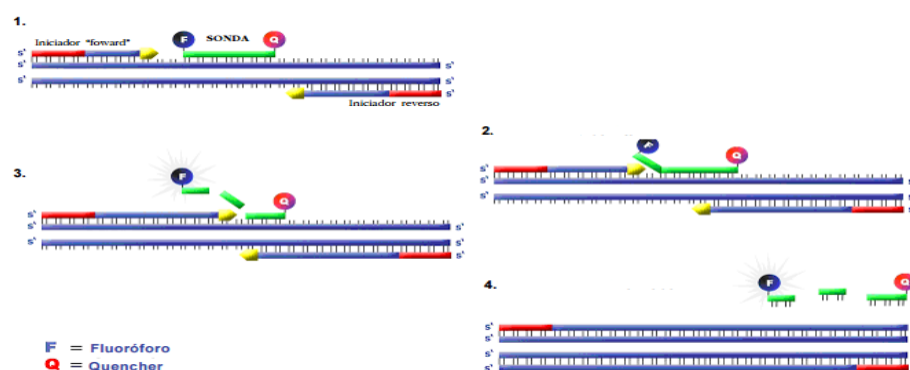


Figura 8- Representação do método PCR em tempo real com sonda *TaqMan* (indicada a verde). Os *primers* de amplificação estão representados a vermelho.

A sonda *TaqMan* utilizada (P_18SrRNA: FAM-
CGGGTGCTTTTATTAGACCAAGAT-BHQ1) foi marcada com FAM (Amidita de fluoresceína) como fluoróforo e BHQ1 (*Black Hole Quencher-1*) como *quencher*. Os *primers* utilizados na reação foram F_18SrRNA (5'-AGCTAATACATGCAGTGAGC-3') e R_18SrRNA (5'-TGATCGCATGGCCACGAG-3'). As misturas de reação foram preparadas numa câmara de fluxo laminar, e cada uma delas conteve 10µl de mistura de reação 2x *SensiFAST*TM (Bioline), 1µl do *primer* Fw-tick 18S (concentração inicial 6 µM), 1µl do *primer* Rv-tick 18S (concentração inicial 6 µM), 1µl da sonda P_18SrRNA (concentração inicial 5µM), 5µl de H₂O e 2µl de cDNA (preparado como descrito em 2.5), perfazendo um volume de 20µl. As reações de amplificação decorreram num termociclador 7500 *Fast Real time* PCR (Applied Biosystems), tendo sido utilizado um protocolo que compreendeu um passo de desnaturação inicial a 95°C (1 minuto), seguindo-se 40 ciclos de desnaturação rápida a 95°C (10 segundos) e hibridação/extensão a 60°C (45 segundos).

2.11. Análise de DNA por eletroforese em gel de agarose

Os produtos de PCR (ou fragmentos resultantes da digestão enzimática de DNA plasmídico; ver seções seguintes) foram analisados por eletroforese em gel de agarose a 1% ou 1,5% (dependendo do tamanho das moléculas a analisar). Foi utilizado como tampão de eletroforese TAE (40mM Tris-Acetato, 1mM EDTA, pH 8,0), ao qual foi adicionado agarose, que foi posteriormente fundida sob aquecimento. Após breve arrefecimento da agarose fundida, foi adicionado 5 µl de brometo de etídeo para que seja possível a visualização dos fragmentos de DNA quando irradiados com luz UV (concentração final 0.5µg/mL de gel). A mobilidade electroforética das moléculas de DNA foi comparada com os fragmentos de DNA observáveis analisando 2µl de um marcador de massas moleculares (*NZYDNA Ladder VI*, NZYtech) ou *1kpb* (Invitrogene). A visualização das bandas obtidas foi feita através da irradiação do gel com radiação UV num equipamento Gel-Doc XR (BioRad).

2.12. Isolamento de vírus em cultura celular

Após os rastreios moleculares efetuados, foi tentado o isolamento de alguns dos vírus detetados usando linhas celulares mantidas em cultura. Para tal, parte dos macerados onde a presença de genomas virais fora revelada no rastreio molecular (conservada a -80 °C especificamente para esse efeito), foram utilizados para infetar as linhas celulares Vero E6 (células epiteliais de rim de macaco verde africano) e DH82 (macrófagos de origem canina). Estas células foram mantidas a 37°C com 5% de CO₂ em meio *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Lonza) suplementado com 10% de soro fetal bovino (FBS) até à obtenção de uma camada semi-confluyente quando cultivadas

Material e Métodos

em frascos de cultura T₂₅ (Nunc). O sobrenadante dos macerados foi diluído em 0,5 ml de PBS, esterilizado por filtração através de um filtro descartável (0.22µm Acrodisc[®] *syringe filters*, Pall Corporation) adaptado a uma seringa, e então colocado em contacto com as células. Após 1 a 2 horas à temperatura ambiente (permitindo a eventual adsorção de vírus às células), o inóculo foi removido e substituído por 5ml de meio de cultura suplementado com 2% de soro fetal. As culturas celulares foram incubadas a 37°C (tal como acima descrito) durante uma semana, tendo sido realizadas duas passagens cegas (após a inoculação inicial). Os sobrenadantes de cultura recolhidos foram armazenados a -80°C até posterior utilização. O efeito citopático (CPE) foi avaliado comparando a evolução das culturas expostas a sobrenadante de carraças com culturas controlo (não expostas a um inóculo potencialmente contendo vírus), através da sua observação microscópica usando um microscópio invertido (observações registadas em fotografias digitais).

2.13. Extração de RNA total a partir de sobrenadantes de cultura

O sobrenadante das culturas que evidenciaram maior efeito citopático durante a primeira semana após exposição ao macerado de carraça foram utilizados como material de partida para a extração de RNA total, usando, para tal, o sistema comercial *ZR Viral RNA Kit*[™] (Zymo Research). Foram seguidas as instruções do fabricante, que pressupõem a adição de três volumes de *ZR Viral RNA Buffer* por cada volume de amostra o que, no caso dos ensaios efetuados, envolveram a adição de 600µl de *Viral RNA Buffer* a 200 µl de amostra num tubo Eppendorf[®] de 1,5ml. Após uma breve agitação, a mistura foi transferida para uma coluna inserida num tubo coletor, e o conjunto centrifugado 2 minutos a 12.000 g, à temperatura ambiente, tendo-se descartado o eluato. Adicionou-se, em seguida, 500µl de *Viral Wash Buffer* à coluna, seguida de nova centrifugação (2 minutos). A coluna foi transferida para um tubo DNase/RNase-Free, e o RNA eluído em 15µl de água livre de RNAses. Posteriormente,

Material e Métodos

os extratos de RNA foram usados para síntese de cDNA por transcrição reversa, como descrito em 2.5 e rastreados para a presença de flebovírus por *multiplex*-PCR, como descrito anteriormente em 2.9.

2.14. SISPA (*Sequence-Independent Single Primer Amplification*)

A detecção de sequências virais usando SISPA foi tentativamente efetuada usando como material de partida a fração líquida de macerados de ixodídeos, bem como alíquotas de sobrenadante de cultura, inicialmente submetidos a um pré-tratamento de modo a enriquecer as amostras analisadas em ácidos nucleicos virais. Esse pré-tratamento incluiu uma centrifugação de 10 minutos (4°C e 11.000 g) de forma a remover detritos celulares. Posteriormente, foi recolhida a fração líquida e o volume ajustado para 300µl com H₂O, seguida da sua esterilização por filtração (0.22µm; Acrodisc[®] syringe filters, Pall Corporation). Aproximadamente 200µl do filtrado foi adicionado 20µl de tampão de DNase, 50 unidades de DNase I (5µl), 2,5 µl de RNase (1mg/ml), e as misturas assim obtidas foram posteriormente incubadas duas horas a 37°C. Este passo teve como objetivo permitir a degradação de ácidos nucleicos contaminantes, não-encapsidados (não-virais), sendo que os ácidos nucleicos virais não são degradados por se encontrarem protegidos pela cápside viral.

Após este pré-tratamento, foi feita a extração de RNA total com recurso ao kit de extração *ZR Viral RNA Kit*[™] (Zymo Research), tendo sido utilizado o procedimento sugerido pelo fabricante (mencionado no ponto 2.13), e tendo o RNA extraído sido eluído em 20µl água livre de RNases. Posteriormente, o extrato de RNA foi utilizado como ponto de partida para a síntese de cDNA por transcrição reversa. A 10µl de extrato de RNA foram adicionados 2µl do *primer* FR26RVN (5'-GCCGGAGCTCTGCAGATATCNNNNN-3') diluído a 10pmol/µl. Após 5 minutos a 65°C, e aos quais se seguiram 5 minutos em gelo, foi adicionado 8µl de uma mistura

Material e Métodos

contendo, por cada amostra a analisar, 4µl de solução tampão de reação concentrada 5X, 1µl de inibidor de RNAses (*RiboLockTM RNase inhibitor*), 2µl de uma mistura de dNTPs concentrados a 10mM e 1µl de transcriptase-reversa (*RevertAidTM H Minus M-MuLV*). As misturas de reação foram agitadas em vórtex e colocadas num termociclador PCR EXPRESS, em que o perfil térmico consistiu um passo de hibridação a 25°C durante 10 minutos, extensão a 42°C durante 60 minutos e inativação da transcriptase-reversa a 94°C durante 3 minutos.

A segunda cadeia de DNA foi sintetizada usando cDNA e polimerase *Klenow*. Para tal, a 20µl de cDNA foi adicionado 2µl de tampão da enzima e cinco unidades de polimerase Klenow (0,5µl), tendo as misturas sido mantidas 1 hora a 37°C, seguido de 10 minutos de incubação a 75°C para inativação da enzima. Uma fração (5µl) das misturas de reação contendo moléculas de dsDNA foram adicionados a uma mistura de reação contendo 15µl de *NZYTaq 2x Green Master Mix*, 6µl de H₂O e 4 µl (40pmol) do *primer* FR20RV (5'-GCCGGAGCTCTGCAGATATC-3'), o qual é complementar à porção 5' do *primer* FR26RVN (70), e com base na utilização do qual se promove a amplificação de DNA durante a PCR. As PCR ocorreram num termociclador PCR EXPRESS, tendo sido utilizado um protocolo que consistiu num passo inicial de desnaturação a 94°C (2 minutos), seguindo-se 40 ciclos de uma etapa de desnaturação a 94°C (30 segundos), uma etapa de hibridação a 55°C (1 minuto), e uma etapa de extensão de 72°C (2 minutos). Por fim, foi efetuado um passo de extensão final de 72°C (5 minutos), seguido de um passo de manutenção das reações a 4°C. Os produtos resultantes da amplificação foram analisados por eletroforese em gel de agarose (como descrito em 2.11).

2.15. Clonagem molecular

Os produtos de PCR obtidos através da utilização da técnica de SISPA foram clonados num vetor plasmídico, usando *Escherichia coli* como hospedeiro. O vetor de clonagem utilizado foi o vetor *pGEM[®]-T Easy* (Promega), disponibilizado comercialmente sob a forma de um vetor linearizado que apresenta resíduos de nucleótidos de timidina no extremo 3' em ambas as extremidades, o que (i) permite aumentar a eficiência da ligação entre moléculas de vetor e insertos com extensões 3' adeniladas e (ii) evita a recircularização do vetor.

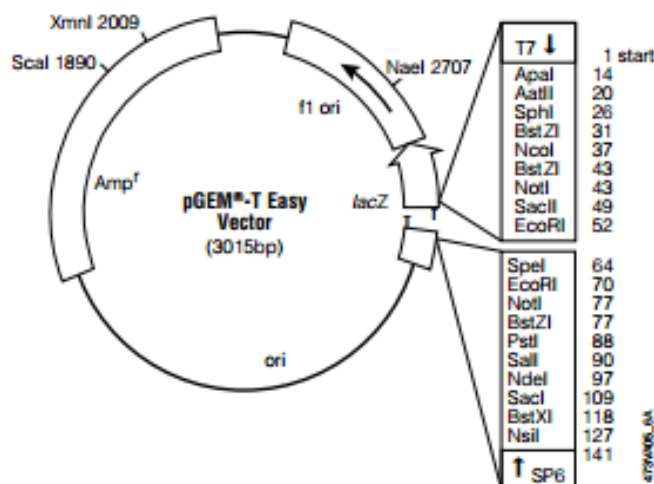


Figura 9 - Esquema representativo do vetor plasmídico *pGEM[®]-T Easy*.

O vetor utilizado possui uma origem de replicação e um marcador de seleção (gene *bla*). Este gene (*bla*) codifica uma enzima (β -lactamase) que catalisa a hidrólise do anel β -lactâmico da ampicilina, conferindo às bactérias que o transportem resistência à ampicilina (*Amp^R* na Figura 9). O sítio de clonagem múltipla (sequências de nucleótidos que correspondem a sítios de clivagem com enzimas de restrição) é flanqueado pelos promotores de transcrição dos fagos T7 e SP6, que se encontram inseridos na porção do gene *lacZ* que codifica o péptido α da enzima β -galactosidase. A expressão desta proteína é induzida na presença de IPTG (isopropil- β -D-

Material e Métodos

tiogalactopiranósido), o qual inativa a proteína repressora LacI, tornando-a incapaz de se ligar ao promotor a partir do qual a transcrição de *lacZ* é induzida. Na ausência de interrupção da sequência de *lacZ*, nas bactérias contendo o plasmídeo *pGEM[®]-T Easy* verifica-se a expressão de uma β -galactosidase ativa, resultado da complementação das frações da β -galactosidase expressas a partir do DNA plasmídico e cromossômico bacteriano (fragmento ω). A β -galactosidase ativa assim reconstituída é capaz de hidrolisar o substrato X-gal (5-bromo-4cloro-3-indolil- β -D-galactopiranósido) e levar à identificação de colônias azuis. Se o plasmídeo tiver sido modificado por inserção de um fragmento de DNA exógeno, este interrompe a sequência de *lacZ* e a célula é incapaz de expressar uma β -galactosidase ativa e hidrolisar o substrato X-gal formando, portanto, colônias brancas.

2.15.1 Obtenção de células *E. coli* competentes e sua transformação

O procedimento utilizado para tornar as células *E. coli* competentes para aquisição de DNA exógeno foi iniciado com a preparação de uma cultura saturada da estirpe JM109, usando 3ml de meio LB líquido. Depois de cerca de 16 horas de incubação sob agitação num agitador orbital (210 rpm e 37°C), esta cultura saturada foi diluída em meio LB líquido de 1:100 (200 μ l de cultura e 20ml de LB), e colocada novamente sobre agitação (210 rpm e 37°C) até ter sido atingida uma densidade ótica a variar entre 0,4- 0,5, medida a 600nm. As células foram recolhidas por centrifugação a 4000 g (4°C durante 10 minutos), o sobrenadante foi eliminado e o sedimento ressuspenso em 1ml de TSS (*Transformation and Storage Solution*) frio. Para a ligação do DNA ao vetor foi preparada uma mistura de ligação contendo 5 μ l de solução tampão de ligação (concentrada 2X), 1 μ l de vetor *pGEM[®]-T Easy* (Promega, EUA), 3 μ l do produto de PCR e 1 μ l de DNA ligase do fago T4 para ligar as extremidades aos fragmentos. A mistura foi incubada durante a noite a 4°C e utilizada no dia seguinte para a transformação de células bacterianas competentes. Para tal, 5 μ l da mistura de ligação foram adicionados a 100 μ l do sedimento celular depois de ressuspenso em

Material e Métodos

500µl TSS. Posteriormente, esta suspensão foi incubada durante 30 minutos em gelo, seguido de 90 segundos a 42°C, e novamente colocada em gelo durante 5 minutos (sofrendo assim choque térmico). Após o choque térmico foi adicionado 900µl de meio LB líquido e a suspensão bacteriana assim preparada colocada sobre agitação suave (75rpm a 37°C) durante 1 hora e 30 minutos. Por fim, adicionou-se 200µl da suspensão bacteriana à superfície de placas de meio LB sólido suplementadas com X-gal (40µg/ml), ampicilina (100µg/ml), e IPTG (17mM). O plaqueamento foi feito com recurso à utilização de pérolas de vidro estéreis, e as placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

2.15.2 Extração de DNA plasmídico por lise alcalina e digestão enzimática

Após uma noite de incubação, as colónias identificadas nas placas de meio seletivo como potenciais hospedeiros de plasmídeos recombinantes (brancas) foram repicadas com um palito estéril para 3ml de meio LB líquido suplementado com ampicilina (100µg/ml). Os tubos foram mantidos sob agitação (210 rpm a 37°C) durante a noite para a obtenção de culturas saturadas. Posteriormente, 1,5ml da cultura obtida foi centrifugada a 11.000 g (numa centrífuga de bancada) durante 1 minuto, de seguida descartou-se o sobrenadante e o sedimento foi ressuspensionado em 300µl de tampão TEG frio (25mM Tris-HCl pH 8,0, 1mM EDTA, 1% glucose), seguida da adição de 300µl de tampão de lise (0,2M NaOH, 1,5% SDS) e misturado por inversão. Posteriormente, foi adicionado 300µl de acetato de potássio (para promover a precipitação de resíduos celulares associados a moléculas de SDS) e os tubos centrifugados a 11.000 g durante 15 minutos. Os ácidos nucleicos presentes nos sobrenadantes recolhidos foram precipitados com 700µl de isopropanol (após a sua mistura por inversão) e centrifugados a 11.000 g durante 30 minutos para sedimentação dos ácidos nucleicos precipitados. De seguida, rejeitou-se o sobrenadante, e adicionou-se 500µl de etanol a 70%, seguido de agitação em vórtex. Os tubos foram novamente centrifugados a 11.000 g durante 10 minutos, o sobrenadante descartado e o sedimento

Material e Métodos

de ácidos nucleicos seco sobre vácuo. De seguida, o sedimento foi ressuspenso em 30µl de TE suplementado com RNase (10µg/ml), e incubado a 37°C durante 1 hora e 30 minutos para remoção do RNA contaminante. O DNA plasmídico foi, posteriormente, digerido com a endonuclease *EcoRI* em misturas de digestão contendo, por cada uma delas, 15µl de H₂O, 2µl tampão *EcoRI* concentrado 10x e 1µl de enzima (concentrada a 10µm/µl). Distribuiu-se 18µl por cada tubo de 1,5ml, ao qual se adicionou 2µl de DNA plasmídico de forma a iniciar a sua digestão enzimática. Após agitação suave, as misturas de reação foram mantidas em banho-maria a 37°C durante a noite. Os produtos resultantes da digestão enzimática do DNA foram observados em gel de agarose a 1,5%, tal como descrito em 2.11.

2.15.3 Purificação de DNA plasmídico

Para a purificação do DNA plasmídico foi utilizado o kit *DNA Clean & Concentrator*^{TM-5} (Zymo Research) e tendo em consideração o protocolo sugerido pelo fabricante. A 25µl de DNA plasmídico adicionou-se 75µl de H₂O para perfazer 100µl, e posteriormente a adição de 200µl de *DNA Binding Buffer*. Após uma homogeneização breve por recurso a um vórtex (suave), a mistura foi transferida para uma coluna *Zymo-Spin*TM *Column* inserida num tubo coletor, seguida de centrifugação durante 30 segundos. O eluato foi descartado, e a cada coluna foi adicionado 200µl de *DNA Wash Buffer*, seguida de centrifugação a 11.000g durante 30 segundos; o eluato foi novamente descartado e este passo foi repetido. A coluna foi transferida para um tubo Eppendorf[®] de 1,5ml, e a esta foi adicionado 11µl de *DNA Elution Buffer* (solução tamponada para eluição do DNA extraído), seguida de incubação durante 5 minutos à temperatura ambiente. Os produtos resultantes da purificação do DNA plasmídico foram visualizados em gel de agarose a 1%, como descrito no ponto 2.11. O DNA plasmídico foi sequenciado por uma empresa de biotecnologia (STABVIDA, Portugal), como serviço externo.

2.16. Análise bioinformática

Os cromatogramas obtidos, referentes a cada uma das reações de sequenciação efetuadas, foram analisados e editados recorrendo ao programa informático *BioEdit Sequence Alignment Editor* versão 7.2.5 (74). Cada uma das sequências foi corrigida manualmente e a pesquisa de sequências homólogas depositadas nas bases de dados foi realizada com recurso aos programas BLASTn e BLASTx (disponíveis em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Os alinhamentos múltiplos que serviram de base para a análise filogenética foram construídos por utilização do programa MAFFT versão 7 (referido no ponto 2.6.).

As árvores filogenéticas foram construídas recorrendo ao programa Mega versão 6 (75), tendo sido utilizadas duas abordagens: uma baseada no algoritmo de junção de vizinhos (*Neighbor-Joining* ou NJ), e uma outra baseada no critério de máxima verosimilhança (*Maximum-Likelihood*). As matrizes de distâncias genéticas com base nas quais foram construídas as árvores de NJ foram corrigidas segundo a fórmula de Kimura 2-Parâmetros, enquanto o modelo utilizado na pesquisa da árvore de máxima verosimilhança foi o GTR+I+ Γ , selecionado segundo os critérios de informação de Akaike, como definido pela aplicação jModelTest(76). A robustez das topologias sugeridas foi efetuada com base em 1000 réplicas de amostragem aleatória dos dados iniciais, e foram considerados como significativos os valores de *bootstrap* iguais ou superiores a 75%.

Resultados

3. RESULTADOS

3.1. Detecção de sequências genómicas de Thogotovirus

A detecção de sequências genómicas de *Thogotovirus*, potencialmente presentes nos macerados de carraças analisados, foi realizada tendo por base a amplificação de sequências virais, através da técnica *heminested*-PCR, mediante a utilização de um conjunto de *primers* degenerados (Thogoto_F1, Thogoto_R1 e Thogoto_R2), previamente desenhados para esse efeito. Uma vez que o genoma viral dos vírus pertencentes ao género *Thogotovirus* é constituído por segmentos de RNA, foi necessário proceder à sua extração, seguida da sua respetiva retro-transcrição para a síntese de cDNA, antes que se pudesse proceder à amplificação das sequências virais pretendidas.

Precedente à detecção de sequências genómicas de *Thogotovirus*, foi realizado um controlo de forma a avaliar a nossa capacidade em detetar cDNA sintetizado a partir de RNA extraído segundo as condições utilizadas. Infelizmente, não nos foi possível utilizar um controlo positivo correspondente a RNA extraído a partir de suspensões contendo togotovírus em consequência da ausência destes da coleção de isolados de referência do grupo de Virologia do IHMT. Idealmente, a utilização deste controlo deveria permitir avaliar a eficiência quer dos processos de maceração e extração de RNA, quer da sensibilidade/especificidade dos *primers* desenhados para o efeito. Optámos, então, por uma estratégia alternativa. Esta implicou a detecção, não de sequências virais, mas sim de um RNA por certo presente nos extratos preparados.

As amplificações pretendidas foram executadas usando PCR em tempo real e como alvo o rRNA 18S de carraças de corpo duro. Tendo este sido amplificado em todos os extratos de cDNA preparados, revelando-se abundante (superior às concentrações padrão) (Figura 10), foi garantida a eficiência dos processos de maceração e extrações utilizados. Ainda que os RNAs usados como alvo sejam, pela sua natureza, muito abundantes e, por isso, *a priori* fáceis de detetar, a amplificação de sequências de rRNA permitiu adicionalmente verificar a ausência de inibidores de amplificação nos extratos de RNA preparados a partir dos macerados.

Resultados

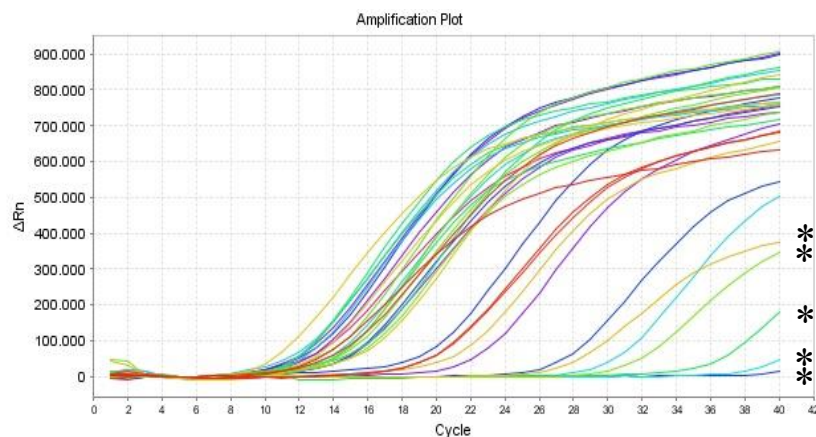


Figura 10- Resultados da amplificação por PCR em tempo real dirigida para o RNA da sub-unidade ribossomal pequena (18S rRNA) de carraças. A sonda *TaqMan* utilizada foi marcada com FAM como fluoróforo e BHQ1 como *quencher*. (*) Indica as curvas de amplificação referentes à utilização de diferentes quantidades de um DNA padrão (DNA de *Ixodes ricinus*): 5×10^6 , 5×10^5 , 5×10^4 , 5×10^3 , 5×10^2 , 50 (fg/ul).

De forma a gerir e rentabilizar custos, e também por uma questão de facilidade de manipulação, as carraças foram previamente agrupadas em *pools* de no máximo 10 indivíduos, separados por espécie, local e data de colheita. No total, foram preparados e analisados 40 extratos de cDNA, correspondentes a 40 *pools* comportando um total de 339 ixodídeos. Dos 40 extratos analisados, 20 correspondiam a extratos incluindo ixodídeos da espécie *Rhipicephalus sanguineus*, 12 de *Rhipicephalus bursa*, 5 de *Dermacentor marginatus* e 3 de *Hyalomma marginatum*. Os resultados consequentes das amplificações efetuadas foram visualizados por eletroforese em gel de agarose. A tentativa de deteção de sequências genómicas pertencentes a vírus do género *Thogotovirus* revelou originar pontualmente (não observado em todas as reações realizadas) múltiplos produtos de amplificação pouco abundantes, revelados pela observação de várias bandas resultantes, muito provavelmente, de amplificações não-específicas. Somente em três das reações efetuadas a reação de amplificação revelou conter amplicões (produtos de amplificação) com aproximadamente o tamanho esperado (≈ 600 pb; Figura 11).

Resultados

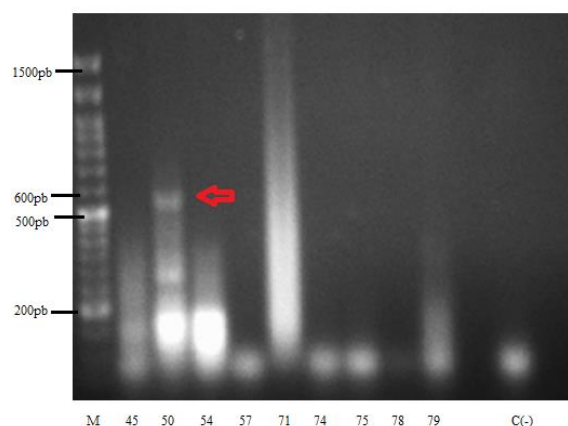


Figura 11 - Observação de produtos da segunda reação de *heminested*-PCR resultantes da amplificação tentativa de sequências genômicas de vírus do género *Thogotovirus*, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. **M** - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). **C(-)** – Controlo negativo. O fragmento indicado pela seta vermelha deverá apresentar, aproximadamente, 600 nt. pb.

Assim, de um total de 40 extratos analisados, as amplificações efetuadas apenas permitiram a observação de produtos compatíveis com a presença de sequências virais de *Thogotovirus* em apenas três dos extratos analisados (24, 40, e 50). Os extratos em questão foram preparados a partir de macerados de carraças das espécies *Rh. sanguineus* (extrato 24), *Hy. marginatum* (extrato 40) e *Rh. bursa* (extrato 50), capturadas na povoação da Comporta, no EVOA e na Herdade da Ribeira Abaixo, respetivamente. Os macerados dos respetivos extratos, previamente guardados para o efeito a -80°C , foram mais tarde utilizados nas tentativas de isolamento de vírus que vieram a ser efetuadas, usando, para o efeito, células em cultura da linha celular Vero E6.

3.2. Detecção de sequências genômicas de *Phlebovirus*

A deteção de sequências genômicas de *Phlebovirus* foi efetuada inicialmente fazendo uso de uma abordagem semelhante à anteriormente descrita em 3.1, mediante a

Resultados

utilização de um conjunto de *primers* degenerados que incluíram PhlebAll_F1 e PhlebAll_R1 como *primers* externos e Bhanj_F2, SFTSV_F2 e UukcPhle_F2 como *primers* internos (em combinação com PhlebAll_R1). Estes *primers* foram delineados com base na identificação de regiões conservadas por inúmeras sequências do segmento L de muitos deste vírus e que, por sinal, vieram a coincidir com as regiões conservadas que serviram de base ao desenho dos *primers* ppL1 e ppL2 por Matsuno e colaboradores (31). Ao contrário da degeneração utilizada por Matsuno e colaboradores (31), que alia a degeneração convencional à utilização de nucleótidos contendo Inosina, os *primers* desenhados neste estudo apenas utilizam a degeneração convencional. Perante a dificuldade inerente em identificar *primers* que permitissem a execução de amplificações que, por sua vez, explorassem as vantagens da técnica de *nested*-PCR (dada a elevada degeneração de alguns deles), optou-se pela execução de protocolos de *heminested*-PCR. Os alinhamentos efetuados e as árvores filogenéticas que com base neles foram construídas, permitiram a identificação de três grandes *clusters* (agrupamentos) de sequências virais. Assim, foi desenhado um par de *primers* que deveria permitir a amplificação de qualquer sequência de flebovírus num primeiro passo de PCR, enquanto para o segundo passo de amplificação, foram usados *primers* que, em combinação com um dos utilizados no passo de amplificação anterior, deveriam permitir a deteção de vírus integrantes dos três *clusters* genéticos acima referidos. Estes vieram a ser designados de vírus da linhagem que inclui o vírus Bhanja (*primer* Bhanj), da linhagem que inclui o vírus SFTSV (*primer* SFTSV), e do grande grupo monofilético que inclui os vírus de tipo Uukuniemi, bem como outros flebovírus tais como os vírus Toscana e Napoles, os quais circulam na bacia mediterrânica (*primer* UukcPhle).

Desta forma, a utilização deste conjunto de *primers* em três reações de segunda-amplificação, independentemente iniciadas com os produtos de um mesmo PCR inicial, deveria permitir a deteção de sequências genômicas de vírus dos grupos Bhanja, SFTSV e de tipo Uukuniemi (grupo Uukuniemi e outros flebovírus). Mais uma vez, a ausência de um conjunto indicado de isolados virais com base nos quais deveria ser avaliada a sensibilidade/especificidade dos *primers* desenhados, impediu a realização do conjunto desejado de reações de controlo positivo. Ainda assim, dada a disponibilidade de um isolado do vírus Napoles (*Sandfly fever Naples virus*, ou SFNV) na coleção laboratorial

Resultados

de isolados de referência do grupo de Virologia do IHMT, a sensibilidade/especificidade dos *primers* desenhados foi avaliada apenas testando a capacidade destes de detectar sequência de SFNV. Para tal, foi preparado cDNA a partir de RNA extraído de um sobrenadante de cultura enriquecido no vírus em questão. A análise dos produtos de amplificação obtidos quando os três tipos de segundas amplificações foram analisadas, revelou a presença de um amplicão com a dimensão esperada (aproximadamente 315 pb) apenas na reação de amplificação em que foi utilizado o par de *primers* PhlebAll_R1 e UukcPhle_F2 (Figura 12). Adicionalmente, as reações de amplificação executadas quando utilizados os *primers* PhlebAll_R1 e Bhanj_F2 ou SFTSV_F2 deram origem a vários produtos de amplificação não-específica (Figura 12).

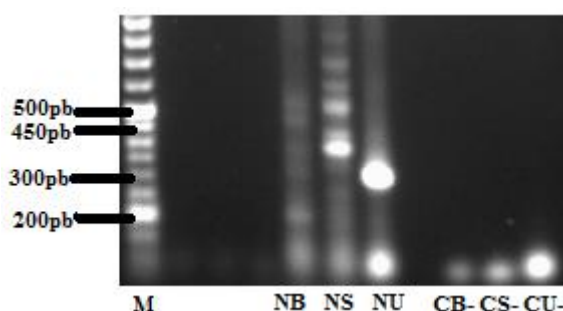


Figura 12 - Observação de produtos da segunda reação de *heminested*-PCR em que foi explorada a capacidade de amplificação de sequências genômicas do género *Phlebovirus* a partir de cDNA preparado com RNA do vírus SFNV. Os produtos de amplificação foram observados após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. **M** - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). **NB** – testado com *primer* interno Bhanj_F2, **NS** – testado com o *primer* interno SFTSV_F2, **NU** - testado com o *primer* interno UukcPhle_F2. **CB-, CS- e CU-** – Controlos negativos com os respetivos *primers*.

Mediante os resultados obtidos, que revelaram que, pelo menos, os *primers* desenhados permitiam a deteção de vírus do grupo para o qual deveriam ser específicos (confirmado por sequenciação do produto de amplificação obtido), optámos por executar os rastreios inicialmente planeados. Assim, foram utilizados todos os conjuntos de *primers* na pesquisa de sequências de flebovírus nos 40 extratos provenientes de macerados de carraças, já rastreados anteriormente para a presença de *Thogotovirus*.

Resultados

Na sua totalidade, as amplificações com os vários conjuntos de *primers* degenerados revelaram inúmeras amplificações não-específicas, traduzidas pela observação de múltiplos produtos de amplificação em muitas das reações de RT-PCR efetuadas. O rastreio efetuado utilizando o *primer* interno Bhanj_F2 (segunda reação de *heminested*-PCR) revelou a presença de bandas ténues em seis extratos analisados, curiosamente correspondendo a fragmentos de DNA com a dimensão esperada (aproximadamente 540 pb) caso estivesse presente no macerado um vírus do grupo Bhanja. Os extratos indicados como a origem dos potenciais produtos de amplificação de sequências virais de flebovírus do grupo Bhanja (números 8, 10, 19, 50, 51, e 72), foram preparados a partir de macerados de ixodídeos das espécies *Rh. sanguineus* (8, 10 e 72), *Rh. bursa* (50 e 51) e *De. marginatus* (19), recolhidas na Herdade da Ribeira Abaixo, à exceção dos indivíduos representantes do macerado 72, os quais foram coletados no EVOA.

O rastreio efetuado utilizando o *primer* interno SFTSV_F2 na segunda reação de *heminested*-PCR, direcionado para a deteção de vírus do grupo SFTSV, traduziu-se na observação de bandas correspondentes a fragmentos de DNA com os tamanhos esperados em seis extratos dos 40 analisados, e também a presença de várias bandas de amplificação não-específica. Os seis extratos que sugeriram a presença de sequências virais de *Phlebovirus* do grupo SFTSV corresponderam aos identificados pelos números 10, 19, 40, 68, 70 e 72. Estes extratos foram preparados a partir de macerados de carraças das espécies *Rh. sanguineus* (10, 68, 70 e 72), *De. marginatus* (19) e *Hy. marginatum* (40), recolhidas na Herdade da Ribeira Abaixo (10 e 19) e as restantes no EVOA.

A deteção de sequências genómicas de *Phlebovirus* do grupo Uukuniemi foi efetuada utilizando o *primer* UukcPhle_F2 como *primer* interno, em combinação com o *primer* PhlebAll_R1 na segunda reação de *heminested*-PCR. Foi possível observar bandas correspondentes a produtos de amplificação com tamanhos esperados em 13 reações (extratos número 3, 5, 6, 8, 10, 19, 23, 40, 45, 51, 70, 72 e 74). Os extratos identificados como potenciais amplificações de sequências virais de *Phlebovirus* do grupo Uukuniemi eram provenientes de macerados de carraças das espécies *Rh.*

Resultados

sanguineus (6, 8, 10, 23, 70, 72 e 74), *Rh. bursa* (3, 5, 45, e 51), *Hy. marginatum* (40), e *De. marginatus* (19), originárias da Herdade da Ribeira Abaixo (6, 8, 10, 19, 45 e 51), EVOA (3, 5, 40, 70, 72 e 74) e da povoação da Carrasqueira (23).

Na totalidade, os 40 extratos analisados com recurso ao conjunto de *primers* degenerados que deveria revelar a presença de flebovírus permitiram identificar 15 extratos onde a presença de sequências genómicas de *Phlebovirus* nos foi sugerida. Seis destes extratos (números 3, 5, 6, 23, 45, 74) foram positivos apenas quando rastreados com o *primer* interno UukcPhle_F2, o extrato 50 apenas revelou a presença de potenciais produtos de amplificação de sequências virais quando rastreado com o *primer* interno Bhanj_F2. O mesmo aconteceu com o extrato 68, que apenas indicou ser positivo com recurso ao *primer* interno SFTSV_F2. Os extratos 40 e 70 foram positivos em dois rastreios efetuados, um com o *primer* SFTSV_F2 e outro com o *primer* UukcPhle_F2, os extratos 8 e 51 revelaram positividade também em dois rastreios, realizados mediante a utilização do *primer* Bhanj_F2 e na utilização do *primer* UukcPhle_F2. Os extratos 10, 19 e 72 apresentaram potenciais produtos de amplificação de sequências virais nos três rastreios efetuados.

A análise dos resultados do rastreio efetuado foi altamente sugestivo do facto de que os *primers* e condições de reação utilizadas se traduzissem numa baixa sensibilidade e especificidade nas deteções pretendidas, apenas confirmando indubitavelmente, a deteção, como esperada, de sequências de SFNV num extrato puro. Por esta razão, foi testada uma nova abordagem, sugerida após a análise do trabalho publicado por Matsuno e colaboradores (31). A deteção de sequências genómicas de *Phlebovirus* foi, então, efetuada tendo por base a amplificação de sequências virais através da utilização de uma abordagem de *multiplex-PCR*, contrariando a abordagem utilizada pelos autores do estudo em causa. Assim, cada reação de PCR foi executada mediante a utilização, não de reações de amplificação independentemente executadas com os *primers* ppL1 e ppL2 (como originalmente descrito), mas da totalidade dos *primers* em questão. Além dos 40 extratos analisados nos rastreios anteriores, foram testados, adicionalmente, seis extratos não incluídos no rastreio inicial (números 26, 30, 31, 32, 35 e 38), correspondentes a macerados de *Rh. bursa* coletadas no EVOA. No

Resultados

total, foram então rastreadas com a combinação ppL1/ppL2 um total de 398 carraças fêmeas, distribuídas por 46 *pools*. Dos 46 extratos rastreados foram identificados 38 como potencialmente sugestivos de conterem genomas de flebovírus, uma vez que deram origem, após a amplificação efetuada, a uma banda intensa, de aproximadamente 500 pb, sendo este o tamanho esperado para os fragmentos a amplificar (Figura 13).

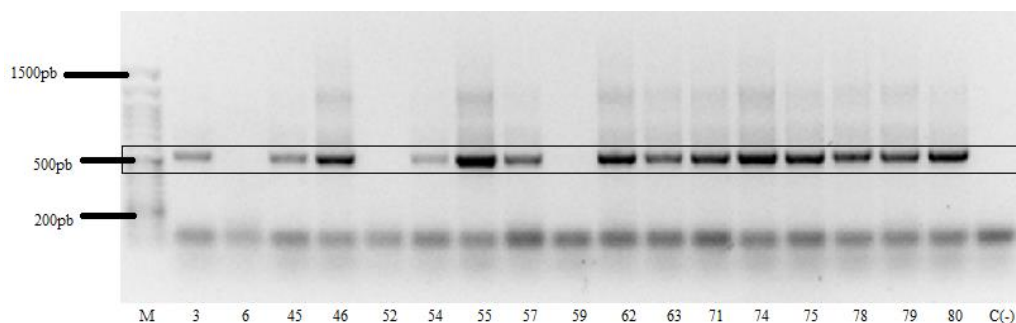


Figura 13 - Observação de produtos da reação de *multiplex*-PCR resultantes da amplificação de sequências genômicas do gênero *Phlebovirus* rastreados com os conjuntos de *primers* ppL1 e ppL2, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. **M** - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). **C(-)** – controle negativo. O retângulo indica o produto de amplificação com as dimensões esperadas (500pb).

Mediante a utilização deste conjunto de *primers* foi observada uma frequência de detecção para *Phlebovirus* de 82,6%. Dada a abundância de carraças das espécies *Rh. sanguineus* e *Rh. bursa* no conjunto analisado, não foi de estranhar que a maioria dos resultados de amplificação obtidos correspondesse a *pools* de ixodídeos destas espécies. Ainda que dados recentes (77) tenham demonstrado a presença de flebovírus em *Hy. marginatum*, todas as reações em que RNA extraído a partir de espécimes desta espécie revelam-se negativas.

Verificando-se uma frequência de detecção tão elevada de flebovírus em carraças fêmeas, pretendemos verificar se o mesmo aconteceria no caso de espécimes machos. Assim, a este rastreio foram adicionados quatro *pools* (dois de *Rh. sanguineus* e dois de *Rh. bursa*) cada um dos quais preparado com 16 carraças provenientes do EVOA. Curiosamente, as reações de RT-PCR efetuadas revelaram a presença de produtos de amplificação com o tamanho esperado (500 pb) também nos quatro extratos

Resultados

provenientes de carraças machos. Os resultados deste rastreio, bem como dos anteriores, podem ser observados na tabela 5.

Espécie	Amostras	Thogoto	Bhanj	SFTSV	UucPhleball	ppL
Rh.b	3	-	-	-	✓	✓
Rh.b	5	-	-	-	✓	✓
Rh.s	6	-	-	-	✓	-
Rh.s	8	-	✓	-	✓	✓
Rh.s	10	-	✓	✓	✓	✓
Rh.s	12	-	-	-	-	✓
Rh.s	13	-	-	-	-	✓
De.m	16	-	-	-	-	✓
De.m	17	-	-	-	-	-
De.m	19	-	✓	✓	✓	-
De.m	20	-	-	-	-	✓
De.m	22	-	-	-	-	✓
Rh.s	23	-	-	-	✓	✓
Rh.s	24	✓	-	-	-	✓
Rh.b	26					✓
Rh.b	30					✓
Rh.b	31					✓
Rh.b	32					✓
Rh.b	35					✓
Rh.b	38					✓
Hy	39	-	-	-	-	-
Hy	40	✓	-	✓	✓	-
Hy	41	-	-	-	-	-
Rh.b	45	-	-	-	✓	✓
Rh.b	46	-	-	-	-	✓
Rh.b	47	-	-	-	-	✓
Rh.b	49	-	-	-	-	✓
Rh.b	50	✓	✓	-	-	✓
Rh.b	51	-	✓	-	✓	✓
Rh.b	52	-	-	-	-	-
Rh.b	54	-	-	-	-	✓
Rh.b	55	-	-	-	-	✓
Rh.b	56	-	-	-	-	✓
Rh.s	57	-	-	-	-	✓

Resultados

Rh.s	59	-	-	-	-	-
Rh.s	62	-	-	-	-	✓
Rh.s	63	-	-	-	-	✓
Rh.s	68	-	-	✓	-	✓
Rh.s	70	-	-	✓	✓	✓
Rh.s	71	-	-	-	-	✓
Rh.s	72	-	✓	✓	✓	✓
Rh.s	74	-	-	-	✓	✓
Rh.s	75	-	-	-	-	✓
Rh.s	78	-	-	-	-	✓
Rh.s	79	-	-	-	-	✓
Rh.s	80	-	-	-	-	✓
Rh.b	81*					✓
Rh.s	82*					✓
Rh.s	83*					✓
Rh.s	84*					✓
Total		3	6	6	13	42

Tabela 5 - Tabela relativa aos resultados dos rastreios efetuados. Rh.s – *Rhipicephalus sanguineus*; Rh.b – *Rhipicephalus bursa*; De.m – *Dermacentor marginatus*; Hy – *Hyalomma marginatum*.

Para garantir que os resultados positivos eram referentes à deteção de RNA encapsidado em partículas virais, os macerados foram tratados inicialmente com DNase I para, desta forma, garantir a remoção de DNA não-encapsidado. No entanto, existe sempre a possibilidade de algum DNA permanecer nos macerados, e consequentemente as sequências amplificadas provirem de genomas virais integrados no cromossoma do hospedeiro sobre a forma de DNA. Desta forma foi realizado um controlo adicional, em que as mesmas condições de amplificação com os *primers* ppL1 e ppL2 foram utilizadas, sendo o extrato de RNA, e não o cDNA correspondente, a matriz de amplificação. Tendo-se observado que dessa forma, não se originavam produtos de amplificação numa amostra aleatória de extratos analisados (Figura 14), os resultados obtidos parecem sugerir que os produtos anteriormente observados teriam resultado da amplificação de sequências virais com origem em RNA. Os resultados parecem indicar então, que as amplificações conseguidas tiveram como origem RNA viral encapsidado em viriões (forma infecciosa), uma vez que no caso deste RNA ter resultado de transcrição de um genoma viral integrado no genoma do hospedeiro, então a respetiva

Resultados

amplificação na ausência de transcrição-reversa originaria na mesma um resultado positivo.

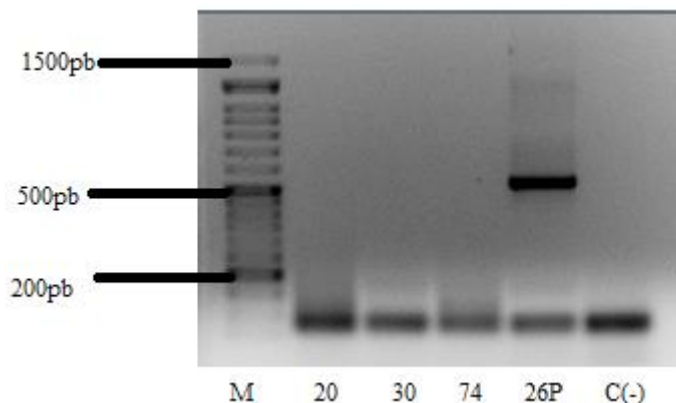


Figura 14 - Observação de produtos da reação de *multiplex*-PCR resultantes da amplificação de sequências genómicas do género *Phlebovirus*, rastreados com os conjuntos de *primers* ppL1 e ppL2, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. **M** - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). **26P**- controlo positivo, cDNA do extrato 26. **C(-)** – controlo negativo.

Os produtos de amplificação correspondentes à análise dos extratos 3, 5, 8, 10, 12, 13, 20, 23, 24, 26, 35, 47, 50, 51, 55, 57, 70, 72, 81*, 82*, 83* e 84* (* indica *pools* de carraças macho) foram purificados e sequenciados, de forma a permitir a confirmação da sua origem, e a análise das sequências obtidas (ver secção 3.4).

3.3. Deteção de sequências genómicas de CCHFV

Os extratos provenientes dos macerados de carraças da espécie *Hyalomma marginatum* (39, 40 e 41) foram adicionalmente rastreados para CCHFV, através da amplificação de sequências virais por *nested*-PCR. Foi, para tal, utilizado o conjunto de *primers* descritos no ponto 2.8. No caso de estar presente CCHFV nos *pools* analisados, este seria revelado através da obtenção de fragmentos de amplificação com a dimensão esperada de 439 pb. Apesar do rastreio efetuado ter revelado a presença de bandas

Resultados

resultantes de amplificações não-específicas, não foram identificadas bandas sugestivas de potenciais produtos de amplificação de sequências virais de CCHFV em nenhum dos extratos analisados (Figura 15).

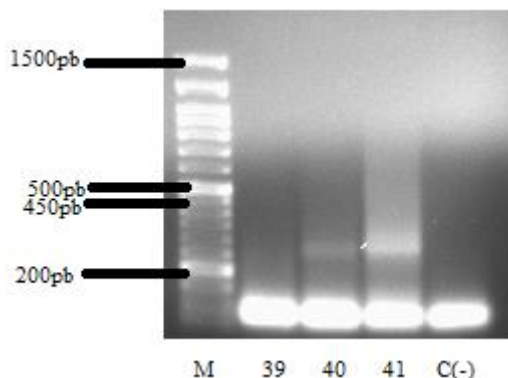


Figura 15 - Observação dos produtos da segunda reação de *nested*-PCR resultantes da amplificação de sequências genômicas de CCHFV, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. **M** - marcador de massa molecular: NZYDNA Ladder VI (NZTtech, Portugal). **C(-)** – controlo negativo.

3.4. Caracterização genética de sequências virais

As reações de amplificação por *multiplex*-PCR utilizando os pares ppL1 e ppL2 de *primers* degenerados, direcionados para o segmento genómico L de *Phlebovirus*, detetaram a presença dessas sequências genómicas em 42 extratos provenientes de macerados de ixodídeos (38 de fêmeas e quatro de machos), o que originou uma frequência de deteção de 84%. Dos 42 extratos positivos, foram selecionados 23 a partir dos quais foram sequenciados os fragmentos de amplificação obtidos. As sequências respetivas foram obtidas quando os fragmentos de DNA foram sequenciados com o *primer* de amplificação HRT-GL2759F. Depois de editadas manualmente (a partir da análise dos cromatogramas respetivos), foram analisadas com recurso aos programas BLASTn /x (anteriormente referido em 2.16), para a confirmação da sua identidade. As pesquisas de sequências homólogas assim efetuadas revelaram sequências nucleotídicas previamente depositadas no GenBank com identidades variando entre 81% e 85%, especialmente quando comparadas com sequências homólogas amplificadas a partir dos

Resultados

genomas de *Phlebovirus* recentemente detetados na Grécia (35) (estirpe Antigone). Estes resultados comprovam, finalmente, a origem dos produtos de amplificação detetados com os *primers* ppL1/ppL2, confirmando a presença quase ubíqua de flebovírus nos macerados analisados. A possibilidade destes resultados terem sido consequência de contaminação cruzada foi descartada posteriormente, quando as sequências obtidas foram analisadas de uma forma mais extensa, e se revelaram ser claramente distintas umas das outras.

De forma a nos permitir proceder a uma caracterização genética mais extensa das sequências obtidas, foram construídos alinhamentos múltiplos das mesmas (n=23; *pools* 3, 5, 8, 10, 12, 13, 20, 23, 24, 26, 30, 35, 47, 50, 51, 55, 57, 70, 72, 81*, 82*, 83* e 84*), que combinaram, adicionalmente, a análise de sequências virais de referência (selecionadas das inúmeras disponíveis nas bases de dados GenBank/EMBL/DDBJ de acesso público; ver Anexo III). A partir desses alinhamentos, foram construídas duas árvores filogenéticas, as quais traduzem as relações de parentesco evolutivo entre as sequências que codificam a polimerase viral (segmento L) analisadas. A primeira, com 104 sequências de referência, que representam a maioria dos *Phlebovirus* conhecidos, foi construída pelo método junção de vizinhos (NJ), em que a matriz de distâncias genéticas corrigida utilizou o modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros (Figura 16 A). Uma segunda árvore foi elaborada com base na análise de 42 sequências de referência (Figura 16 B), representando as grandes linhagens de *Phlebovirus*, e para tal foi utilizado o critério de máxima verosimilhança (ML), tal como descrito na secção Material e Métodos.

As relações filogenéticas inferidas através da análise das árvores obtidas mostraram, na sua generalidade, ser coincidentes entre si. Em ambas, todas as sequências dos fragmentos amplificados a partir dos extratos de cDNA provenientes de macerados das espécies *Rh. sanguineus* e *Rh. bursa* (3A, 5A, 8A, 10A, 12A, 13A, 23A, 24A, 26A, 30A, 35A, 47A, 51A, 55A, 57A, 70A, 72A, 81A, 82A, 83A, 84A e IA), formaram um novo grupo monofilético, estatisticamente suportado por valores de *bootstrap* significativos (100% na árvore de NJ e de 82% na árvore de ML, Figura 16). Este grupo partilha ainda o mesmo ancestral comum que o grupo monofilético

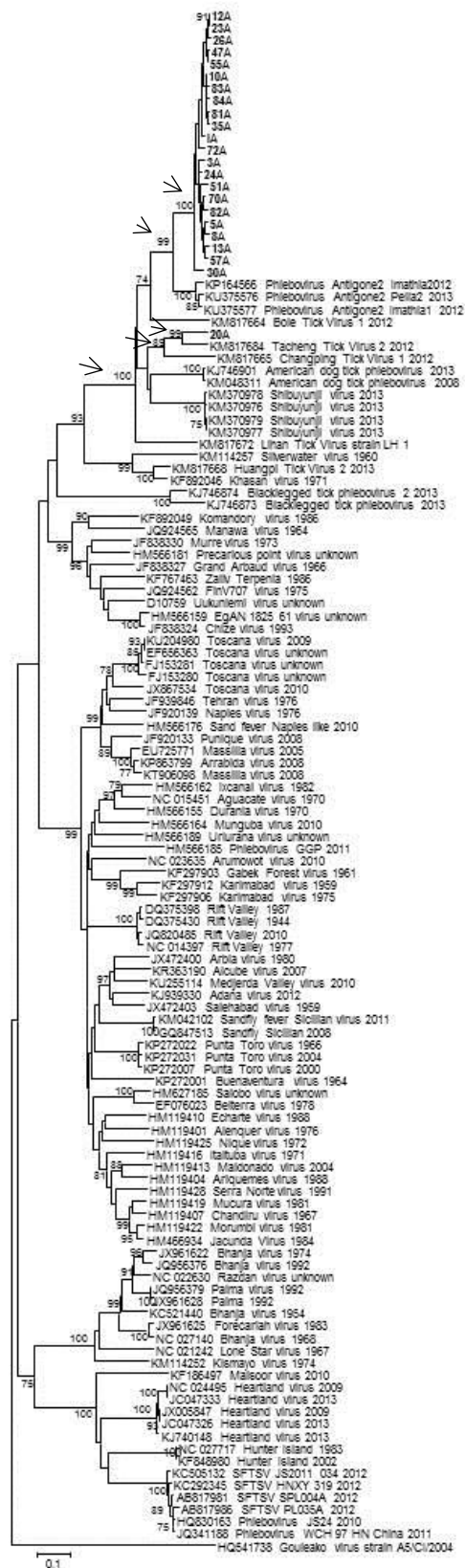
Resultados

representado pelos *Phlebovirus* Antigone2 e, conseqüentemente, formam os dois um grupo monofilético suportado estatisticamente por valores de *bootstrap* elevados (99%/NJ, 91%/ML). A sequência 20A, obtida a partir do fragmento amplificado a partir do extrato de cDNA proveniente de um macerado de *Dermacentor marginatus*, recolhidas na Herdade da Ribeira Abaixo (perto de Grândola), forma um grupo monofilético com uma sequência representada pela estirpe *Tacheng Tick Virus* (número de acesso: KM817684), sendo este grupo suportado por valores de *bootstrap* significativos em ambas as árvores (99%/NJ, 87%/ML). Este grupo forma também um grupo monofilético com a sequência representada pela estirpe *Changping Tick Virus* (número de acesso: KM817665), evidenciando, desta forma que partilhem um ancestral comum, estatisticamente suportado por valores de *bootstrap* significativos (89%/NJ, 97%/ML).

Tendo em conta que as árvores construídas com base nos diferentes métodos revelaram-se consistentes quando comparadas entre si (topologicamente congruentes), podemos concluir que as relações filogenéticas inferidas a partir da análise das sequências virais de flebovírus analisadas revelaram a existência de um novo grupo monofilético no qual se inserem todas as sequências amplificadas a partir de extratos de cDNA provenientes de pools das espécies *Rh. sanguineus* e *Rh. bursa*. Apenas uma sequência (20A), amplificada a partir de um extrato de cDNA proveniente de *Dermacentor marginatus* veio a demonstrar pertencer a um outro grupo monofilético onde estão inseridas duas sequências referência representadas por vírus com origem geográfica na China e a espécie *De. marginatus* como vetor (o vírus Changping Tick utiliza adicionalmente outras espécies do género *Dermacentor*). Ambos os grupos que incluem as sequências amplificadas no âmbito deste trabalho partilham um ancestral comum, sustentado por um valor de *bootstrap* de 100% na árvore de junção de vizinhos e de 99% na árvore de máxima verosimilhança. Adicionalmente, quando analisada a sequência putativa dos produtos por elas codificados, cada linhagem genética parece ser caracterizada pela presença única de grupos específicos de combinações de certos resíduos de aminoácidos na proteína putativa L. Estes resultados estão apresentados no Anexo IV.

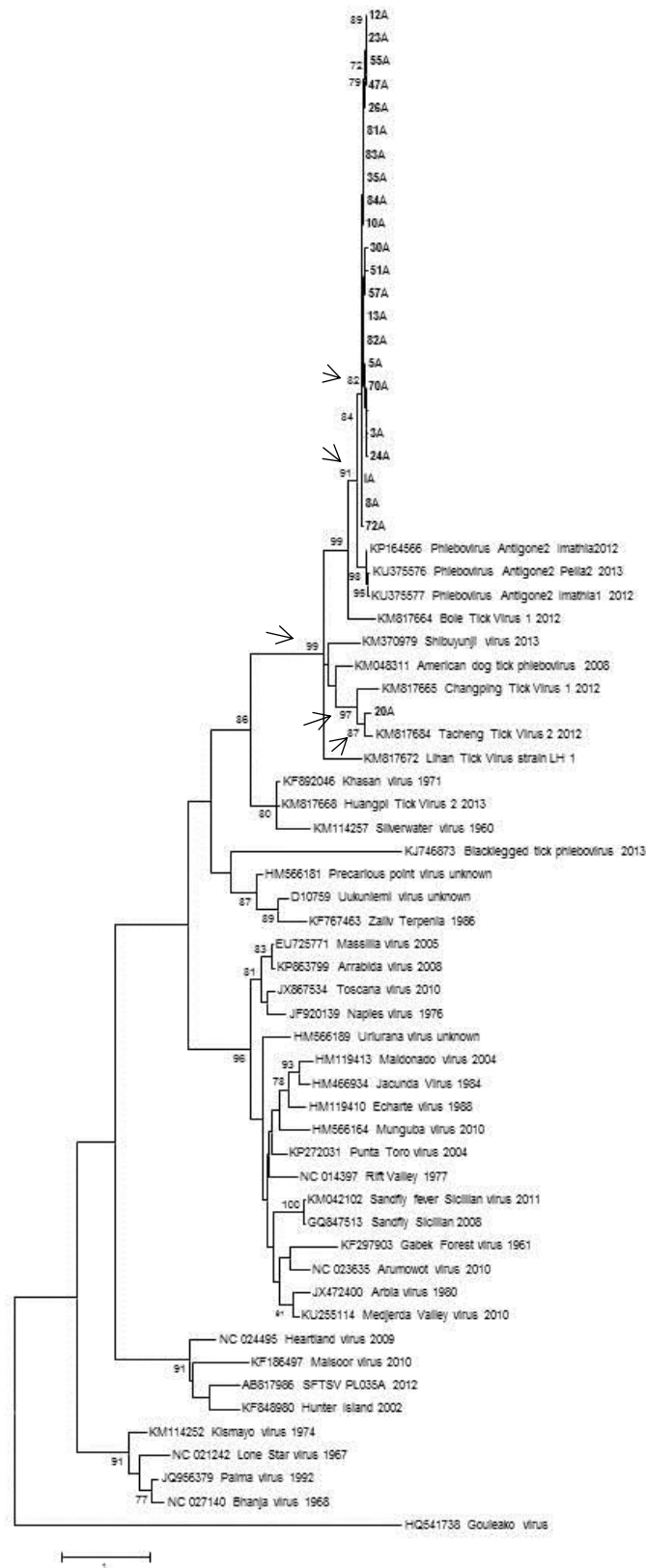
Resultados

(A)



Resultados

(B)



Resultados

Figura 16 – Relações filogenéticas entre sequências parciais do segmento L do genoma de *Phlebovirus*. **(A)** Árvore filogenética construída com base no método de junção de vizinhos (NJ), utilizando como modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros, a partir de 23 sequências amplificadas e 104 sequências virais de referência de *Phlebovirus*. **(B)** Árvore filogenética construída pelo método de máxima verossimilhança (ML), utilizando como modelo GTR+I+ Γ , a partir de 23 sequências amplificadas e 42 sequências de referência. A barra representa a percentagem de distância genética.

3.5. Isolamento de vírus em cultura celular

Com base nos resultados dos rastreios moleculares efetuados foram selecionados aleatoriamente (independentemente dos *primers* utilizados) 11 macerados onde o rastreio revelou a potencial presença de genomas virais. Estes macerados foram, então, utilizados de forma a tentar deles isolar vírus usando células Vero E6 (ATCC CRL-1586). Assim, foram analisados 11 macerados (8, 10, 19, 23, 24, 40, 50, 51, 68, 70, e 72), previamente conservados a -80°C para o efeito. Por limitações financeiras e temporais, alguns dos macerados foram agrupados e inoculados em conjunto (8+10, e 68+70+72). Foram efetuadas duas passagens cegas a partir de cada cultura inicialmente inoculada com macerados de carraça, as quais, ao final de cada semana, foram avaliadas através da observação de eventuais efeitos citopáticos (CPE). Quando comparadas com culturas que não tinham sido expostas a um macerado (culturas controlo), a observação de CPE poderia traduzir a replicação de um vírus. As observações no final da primeira semana permitiram a identificação de CPE (Figura 17), sendo que numa das culturas estes efeitos apenas começaram e ser registados no sexto dia após inoculação.

Resultados

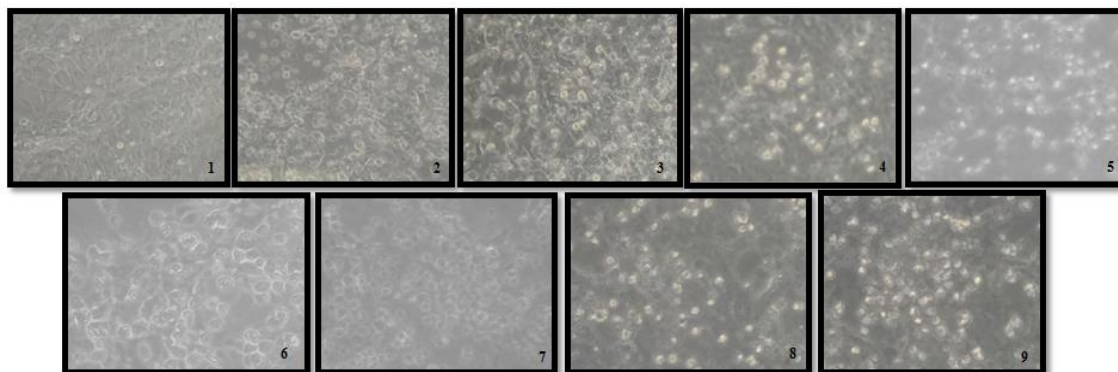


Figura 17 – Observação por microscopia ótica de células Vero E6 (ampliação de 200x), no final da primeira semana. **(1)** Células Vero E6 não inoculadas (cultura controlo). **(2)** Células Vero E6 inoculadas com os macerados 8 e 10. **(3)** Células Vero E6 inoculadas com o macerado 19. **(4)** Células Vero E6 inoculadas com o macerado 23. **(5)** Células Vero E6 inoculadas com o macerado 24. **(6)** Células Vero E6 inoculadas com o macerado 40. **(7)** Células Vero E6 inoculadas com o macerado 50. **(8)** Células Vero E6 inoculadas com o macerado 51. **(9)** Células Vero E6 inoculadas com os macerados 68, 70 e 72.

No final da primeira passagem, apenas duas das culturas celulares expostas aos inóculos iniciais apresentavam CPE ligeiro, sendo que as restantes não evidenciavam diferenças significativas quando comparadas com as culturas de controlo negativo (Figura 18). Curiosamente, no final da segunda passagem, não foram observados efeitos citopáticos nas células expostas aos macerados, comparativamente às culturas controlo. Verificou-se assim, que o CPE apresentado na primeira semana se desvaneceu ao longo das passagens, pelo que, o eventual isolamento de flebovírus foi verificado através de rastreio molecular do genoma viral nos sobrenadantes de cultura.

Resultados

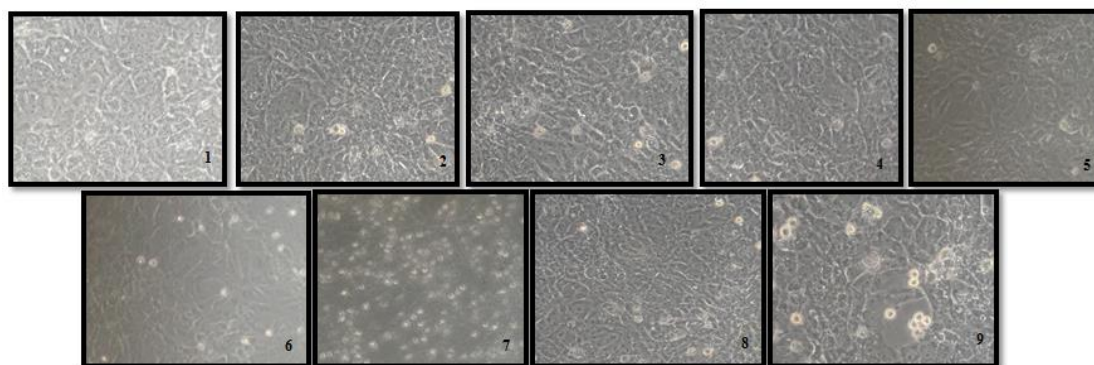


Figura 18 - Observação por microscopia ótica de células Vero E6 (ampliação de 200x), no final da segunda semana. (1) Células Vero E6 não inoculadas (cultura controle). (2) Células Vero E6 inoculadas com os macerados 8 e 10. (3) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 19. (4) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 23. (5) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 24. (6) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 40. (7) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 50. (8) Células Vero E6 inoculadas com o macerado 51. (9) Células Vero E6 inoculadas com os macerados 68, 70 e 72.

Adicionalmente, foi efetuado um ensaio de detecção de sequências virais no inóculo e na sequência de sobrenadantes de cultura decorrentes da utilização dos macerados 50 e 68+70+72 como inóculo, por serem aqueles em que foram observados CPE mais evidentes, tendo-se prolongado depois da primeira passagem cega. Após a extração de RNA e posterior síntese de cDNA a partir dos mesmos, o conjunto de amostras obtidas foi rastreado com os *primers* ppL1 e ppL2. O rastreio molecular revelou em ambos os conjuntos de experiências bandas evidentes, com o tamanho esperado (500 pb) para um produto de amplificação específico, no inóculo e no sobrenadante de cultura da primeira semana (Figura 19). Curiosamente, no conjunto das passagens cegas efetuadas após inoculação de células Vero E6 com o extrato combinado 68+70+72, o fragmento de amplificação esperado foi ainda detetado quando utilizado o sobrenadante colhido ao final da segunda semana (1ª passagem). Como era espectável, não foram detetados produtos de amplificação de sequências de genomas virais de flebovírus nos sobrenadantes da terceira semana.

Resultados

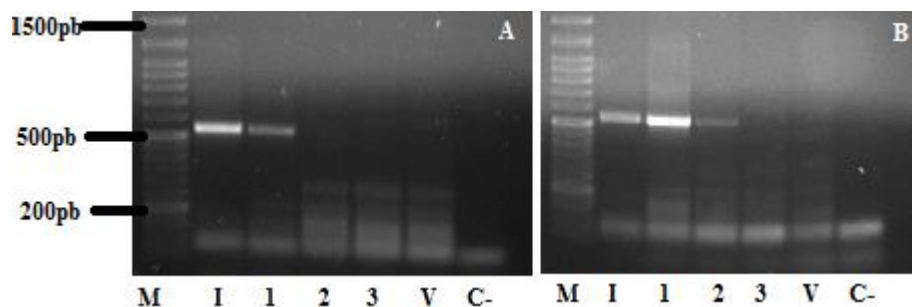


Figura 19 - Observação de produtos da reação de *multiplex*-PCR dirigida à amplificação de sequências genómicas do género *Phlebovirus*, rastreados com os conjuntos de *primers* ppL1 e ppL2, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. **M** - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). **(A)** Inóculo e sobrenadantes de cultura do macerado 50. **(B)** Inóculo e sobrenadantes de cultura dos macerados 68,70 e 72. **I** – inóculo; **1** – sobrenadante da primeira semana; **2** – sobrenadante da segunda semana; **3** – sobrenadante da terceira semana; **V** – sobrenadante da cultura controlo; **C-** – controlo negativo.

Tendo em conta o resultado obtido na tentativa de isolamento de vírus em cultura de células Vero E6, foi ainda tentado o isolamento viral numa outra linha celular, desta feita a linha DH82. Para tal, foram selecionados dois macerados (55 e 74) previamente conservados para o efeito, e os quais, através do rastreio molecular já tinham evidenciado a presença de genomas virais de *Phlebovirus*. Os dois macerados foram inoculados em conjunto e foram efetuadas duas passagens cegas a partir desta inoculação inicial. No final da primeira semana, através da observação da cultura ao microscópio e comparando-a com a cultura controlo, foi possível visualizar CPE. A maioria das células encontrava-se descolada da monocamada de células e formavam grandes agregados celulares (Figura 20).

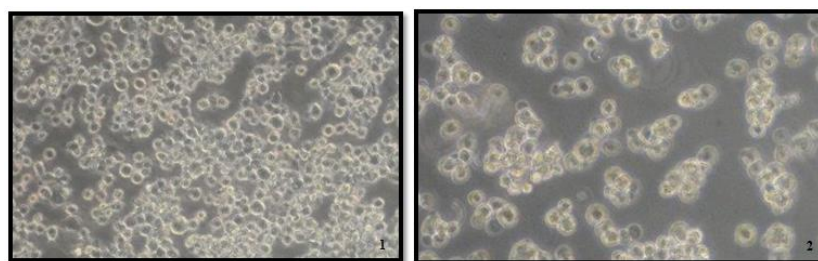


Figura 20 - Observação por microscopia ótica de células DH82 (ampliação de 200x), no final da primeira semana. **(1)** Células DH82 não inoculadas (cultura controlo). **(2)** Células DH82 inoculadas com os macerados 55 e 74.

Resultados

No final da primeira passagem observou-se um CPE mais difuso do que na primeira, no entanto na cultura inoculada observava-se um deslocamento de células da monocamada superior ao observado na cultura controlo. De notar que, ainda que menos abundante, também a cultura controlo apresentava CPE difuso (Figura 21). Na terceira semana e última passagem os resultados observados foram idênticos aos da segunda semana, com o descolamento das células da monocamada, quer na cultura infetada quer na cultura controlo. Este CPE observado nas células controlo (não inoculadas) deve-se provavelmente ao facto deste exigirem uma substituição mais regular do meio de cultura do que aquela que foi feita (só ao final de uma semana para permitir, nas inoculadas, a eventual acumulação de vírus que neles estivessem a replicar).

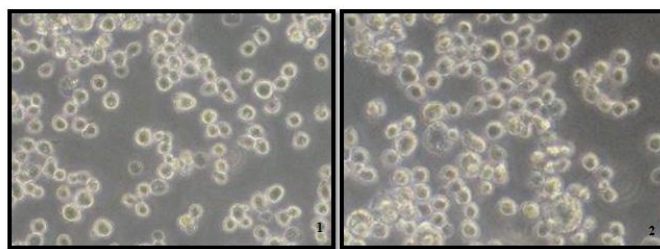


Figura 21 - Observação por microscopia ótica de células DH82 (ampliação de 200x), no final da segunda semana. (1) Células DH82 não inoculadas (cultura controlo). (2) Células DH82 inoculadas com os macerados 55 e 74.

O ensaio de deteção de sequências virais de *Phlebovirus*, efetuado tal como acima descrito, revelou uma banda do tamanho esperado apenas no inóculo (Figura 22). Na segunda semana observa-se uma banda muito ténue (com aproximadamente 600 pb) traduzindo, provavelmente, um produto de amplificação não-específica. Não tendo sido detetados produtos de amplificação de sequências de genomas virais de flebovírus nos sobrenadantes de cultura em células DH82, podemos afirmar que, tal como aconteceu no caso em que nas tentativas de isolamento foram utilizadas células Vero, não foi possível isolar os flebovírus detetados no rastreio molecular efetuado.

Resultados

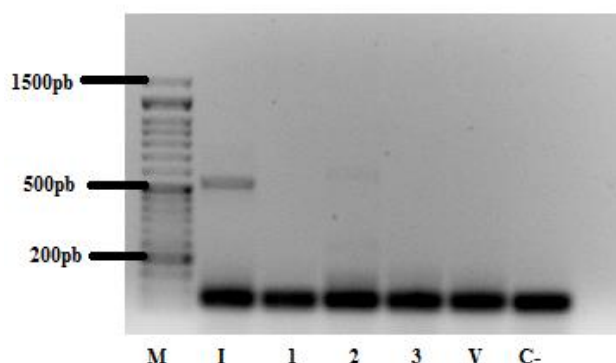


Figura 22 - Observação de produtos da reação de *multiplex*-PCR resultantes da amplificação de sequências genômicas do gênero *Phlebovirus*, no inóculo e sobrenadantes de cultura do macerado 55 e 74, rastreados com os conjuntos de primers ppL1 e ppL2, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. **M** - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). **I** – inóculo; **1** – sobrenadante da primeira semana; **2** – sobrenadante da segunda semana; **3** – sobrenadante da terceira semana; **V** – sobrenadante da cultura controle; **C-** – controle negativo.

3.6. Aplicação da técnica de SISPA à detecção de sequências virais em macerados de carraças

A tentativa de detecção de sequências virais utilizando a técnica SISPA, abordagem que não exige um conhecimento prévio das sequências a detetar, foi efetuada utilizando a fração líquida de dois macerados de carraças (20 e 56), e posteriormente com o sobrenadante colhido uma semana após inoculação de células Vero E6 com os macerados 68+70+72 (amostra menos complexa, em termos de tipos de ácidos nucleicos e sua abundância, do que um macerado de carraças). Esta abordagem requereu um passo de pré-tratamento das amostras a analisar, de modo a enriquecer a fração correspondente a ácidos nucleicos encapsidados em partículas virais, relativamente a eventuais contaminantes. A combinação de tratamentos efetuados incluiu centrifugação, filtração e tratamento com DNaseI e RNase. Após a extração de RNA e a sua conversão em cDNA utilizando o *primer* FR26RVN, seguiu-se a síntese da segunda cadeia com recurso à polimerase *Klenow*, seguindo-se as reações de

Resultados

amplificação com o *primer* FR20RV. Tanto no rastreio efetuado a partir dos macerados 20 e 56, como no rastreio a partir de sobrenadante de cultura da primeira semana após inoculação de células Vero E6 com a combinação dos macerados 68+70+72, foi possível observar a presença de amplificações (Figura 23), sendo que, a utilização desta abordagem não pressupõe a obtenção, necessariamente, de produtos de amplificação com um tamanho específico definido. Apesar da observação de amplificações, não foi, contudo, possível a identificação de bandas abundantes e distintas por forma a proceder à sua purificação para obtenção, subsequentemente, da respetiva sequência nucleotídica. Tendo em vista, ainda assim, a análise de alguns dos produtos de amplificação obtidos, os produtos de PCR resultantes da aplicação da técnica de SISPA à análise dos macerados 20 e 56, foram posteriormente clonados num vetor plasmídico.

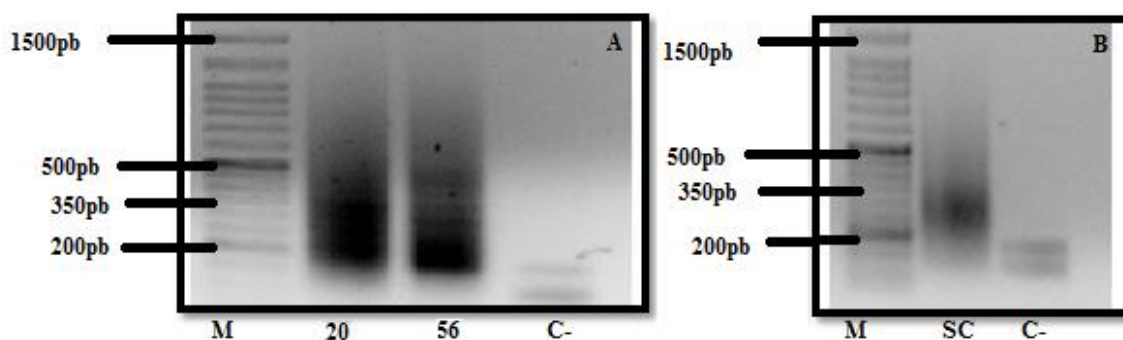


Figura 23 - Observação de produtos de PCR obtidos através da técnica SISPA, após a sua separação por eletroforese em gel de agarose a 1%. (A) A partir de macerados (B) A partir de sobrenadante de cultura da primeira semana dos macerados 68+70+72. **M** - marcador de massa molecular: *NZYDNA Ladder VI* (NZTtech). **SC** – sobrenadante de cultura. **C-** - controlo negativo.

3.7. Clonagem molecular de sequências amplificadas por SISPA

A clonagem dos produtos de PCR obtidos mediante a utilização da técnica SISPA quando aplicada a macerados de ixodídeos (20 e 56) foi efetuada usando o vetor

Resultados

pGEM[®]-T Easy e *Escherichia coli* como hospedeiro de clonagem. A mistura de ligação foi efetuada utilizando diretamente os produtos de PCR originados de SISPA, uma vez que não era possível distinguir bandas definidas para proceder à sua purificação. A seleção dos clones bacterianos possuindo plasmídeos recombinantes foi efetuada visualmente pela observação da coloração das colónias (brancas ou azuis), tendo sido analisadas um conjunto de 11 colónias brancas. Após a extração do respetivo DNA plasmídico e a sua subsequente digestão enzimática utilizando a enzima *EcoRI*, foi analisado o perfil eletroforético obtido. Este revelou, como espectável, a presença de bandas de 3 kpb, correspondentes ao vetor plasmídico linearizado (a enzima *EcoRI* corta o vetor utilizado de ambos os lados do local onde nele podem vir a ser clonados fragmentos de DNA exógeno), e adicionalmente bandas de menores dimensões, correspondentes aos fragmentos de DNA clonados, tal como se pode observar na figura 24. O DNA plasmídico inserido nos clones recombinantes (20A14, 20A2, 20B1, 20B3, 20B4, 20B5, 20B6, 20B20, 56A5, 56B1 e 56B13) selecionados como potenciais fragmentos de interesse na análise eletroforética, foram purificados e posteriormente sequenciados.

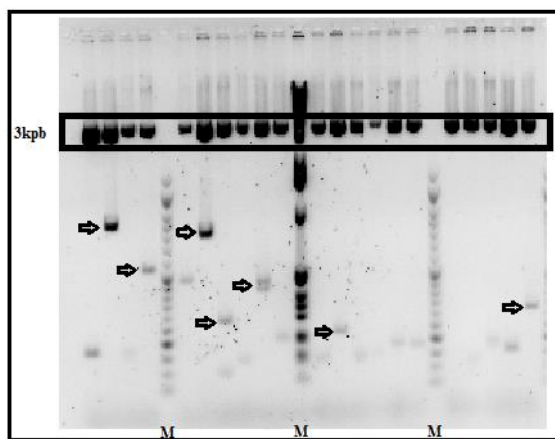


Figura 24 – Perfil electroforético resultante da digestão pela enzima *EcoRI* de clones plasmídicos recombinantes, contendo amplicões obtidos através de SISPA, referentes ao macerado 20. O retângulo em cima apresentado corresponde à zona de bandas respetiva ao vetor plasmídico linearizado (3kpb). As setas assinaladas na figura representam bandas de interesse que posteriormente foram purificadas.

Resultados

As 11 sequências obtidas (20A14, 20A2, 20B1, 20B3, 20B4, 20B5, 20B6, 20B20, 56A5, 56B1 e 56B13), depois de editadas manualmente, foram analisadas com recurso ao programa BLASTn e BLASTx (anteriormente referidos em 2.16), para a confirmação da sua identidade. Infelizmente, nenhuma das 11 sequências analisadas revelaram os resultados pretendidos (sequências virais), sendo que representavam na sua maioria rRNA ribossomais ou outras sequências, provavelmente de origem artrópode (resultados apresentados no Anexo V). Estes resultados evidenciam que o pré-tratamento efetuado em SISPA de modo a remover o RNA e DNA contaminantes e enriquecer a amostra em partículas virais não se revelou eficaz, dado que a eventual representação de sequências virais no conjunto de clones recombinantes obtido seria baixa, provavelmente exigindo o estudo de um muito maior número de clones plasmídicos recombinantes do que o que foi analisado.

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Discussão e Conclusões

Os ixodídeos são considerados, depois dos mosquitos, o vetor artrópode com maior importância em Saúde Pública (1), sendo que, nos últimos anos, temos vindo a assistir a um aumento considerável na incidência e distribuição geográfica de doenças transmitidas por estes (4). Nesta década, assinalada pela tendência crescente em isolar e descrever novos arbovírus (15), muito frequentemente tem-se tirado partido das potencialidades das abordagens metagenómicas em associação às novas tecnologias de sequenciação e alto rendimento. Muitos destes vírus são transmitidos por carraças e correspondem a vírus (re)emergentes já conhecidos anteriormente. Ainda assim, muitos dos que têm sido identificados correspondem a novos vírus, alguns dos quais patogénicos e altamente virulentos. São destes exemplos os recentemente descobertos vírus Bourbon (28), SFTSV (33) e Heartland (34). Adicionalmente, motivados pela perceção de que este tema de estudo tem vindo a ser negligenciado, temos vindo a assistir a um número crescente de estudos direccionados para a identificação de novos vírus transmitidos por carraças.

Comunidades virais de vários ambientes ou hospedeiros têm vindo a ser descritos nos últimos anos por análises de metagenómica (72), explorando as tecnologias genericamente conhecidas como NGS. No entanto, na maioria dos laboratórios, a PCR convencional e as suas adaptações continuam ainda a ser um suporte regular na pesquisa de sequências virais em amostras biológicas, sendo que a sua utilização pressupõe o uso de *primers* complementares às sequências a amplificar. Ainda que estes possam apresentar posições degeneradas, este tipo de abordagens impõem limitações à descoberta de novos vírus divergentes ou inteiramente desconhecidos. Como alternativa, as abordagens onde não é necessário um conhecimento *a priori* das sequências virais a amplificar têm, igualmente, vindo a ser também utilizadas na descoberta de novos vírus.

Devido à enorme limitação no conhecimento relativamente à distribuição de vírus transmitidos por carraças em Portugal, tornou-se pertinente estabelecer como um dos objetivos do presente trabalho a identificação e caracterização de vírus presentes em carraças colhidas no nosso país. Por questões logísticas, as colheitas foram feitas perto da região de Lisboa e Setúbal. Os exemplares coletados foram analisados utilizando

Discussão e Conclusões

duas abordagens distintas, uma delas dependente e a outra independente de um conhecimento prévio das sequências que viríamos a amplificar.

Começámos por utilizar abordagens de *heminested-* e *multiplex*-PCR tendo em vista a deteção de vírus classificados em dois géneros distintos: *Thogotovirus* e *Phlebovirus*. A circulação de vírus de ambos estes géneros fora já anteriormente demonstrada em Portugal, quer através do isolamento do vírus *Dhori* em 1971 (29) e duas estirpes do vírus *Thogoto* em 1978 (30), quer pelo isolamento do vírus Palma em 1992 (13), e recentemente pelo isolamento de flebovírus de tipo Massilia (78) e do vírus Arrabida (79). Desta forma, foram delineados dois conjuntos de *primers* degenerados direccionados para cada um dos géneros.

A pesquisa direccionada para vírus do género *Thogotovirus* englobou a análise de 339 carraças fêmeas distribuídas por 40 *pools* e quatro espécies, *Rh. sanguineus* (n=181), *Rh. bursa* (n=111), *De. marginatus* (n=39) e *Hy. marginatum* (n=8). No total, apenas três dos extratos analisados, cada um preparado a partir de macerados de carraças das espécies *Rh. sanguineus*, *Hy. marginatum* e *Rh. bursa*, foram considerados como potencialmente positivos (detetada a possível presença de sequências virais). O rastreio efetuado para vírus do género *Phlebovirus*, analisando no total as 339 carraças distribuídas por 40 *pools* revelou, numa primeira fase do rastreio efetuado, uma frequência de deteção de 37,5%, resultado da potencial presença de produtos de amplificação em 15 das 40 reações de RT-PCR executadas. Os extratos indicativos de conterem sequências virais de *Phlebovirus* eram na sua maioria provenientes de macerados de carraças *Rh. sanguineus* (os extratos 6, 8, 10, 23, 68, 70, 72 e 74), e de *Rh. bursa* (extratos 3, 5, 50 e 51). Em apenas um *pool* de carraças da espécie *Hy. marginatum* (40) e noutro de *De. marginatus* (19) foi detetada a obtenção de produtos de amplificação.

Na generalidade, as amplificações efetuadas com recurso aos conjuntos de *primers* degenerados desenhados no âmbito deste trabalho, revelaram abundância em produtos de amplificação não-específicos. Tal deverá ser consequência, muito possivelmente, da alta degeneração dos *primers* utilizados combinada com a alta complexidade (na composição em ácidos nucleicos) dos extratos analisados. De facto, e

Discussão e Conclusões

dado que as reações de amplificação executadas tiveram como ponto de partida extratos de RNA preparados a partir de macerados de carraças, para além da eventual presença de RNA viral, os extratos obtidos deverão ser claramente mais ricos em RNA não-viral, com origem nas carraças *per se*, ou nos seus eventuais parasitas e simbiosiontes.

Por forma a contornar estas limitações, deveria ter sido feita a purificação de partículas virais a partir dos macerados, com combinações de filtrações, ultracentrifugações e tratamentos com nucleases, de forma a descomplexar os macerados eliminando os ácidos nucleicos não virais. No entanto, uma vez que este tipo de abordagem normalmente implica a perda da parte da fração viral, e dado que a nossa pesquisa nas reações de amplificação era direcionada, a melhoria das amplificações obtidas poderia ter passado pela utilização de *primers* que, durante a transcrição reversa, não hibridam com sequências ribossomais, as quais deverão ser as mais representadas nos extratos obtidos. Estes *primers* originários de uma análise feita com base num estudo levado a cabo por Endoh e colaboradores (80) revelou que as distribuições dos padrões em hexanucleótidos de RNA ribossomal e genomas virais eram diferentes. Assim sendo, os autores desenharam 96 hexonucleótidos não-ribossomais, ou seja sequências de seis nucleótidos que não se encontram em RNA ribossomal e adicionalmente encontradas em todas as sequências genômicas virais conhecidas. Essas combinações de hexâmeros que preferencialmente não amplificam RNA ribossomal, poderiam ter sido utilizadas na transcrição reversa substituindo assim os hexâmeros aleatórios, melhorando, muito provavelmente, a deteção de sequências virais (80). Apesar das vantagens, esta abordagem não foi executada neste estudo por questões económicas, uma vez que exigia a síntese de 96 *primers*.

Devido ao excesso de amplificações não-específicas causadas eventualmente pela impureza dos extratos aliada à alta degeneração dos *primers* utilizados, as bandas que correspondem aos diferentes produtos de amplificação obtidos foram pouco definidas e por vezes muito ténues, o que impossibilitou a sua purificação direta a partir de géis de agarose e consequente sequenciação. Uma vez que só com base nesta informação poderíamos garantir em absoluto a origem das amplificações efetuadas, essas deteções foram apenas consideradas como putativas.

Discussão e Conclusões

Adicionalmente, foi efetuado um rastreio de *Phlebovirus* com recurso ao conjunto de *primers* degenerados descritos por Matsuno e colaboradores (31). Para além de menos degenerados do que os *primers* aqui desenhados, a deteção de sequências virais por utilização destes *primers* parece ser de tal modo sensível, que ao invés de exigir protocolos de amplificação encadeada (*heminested-* ou *nested-PCR*), permite a sua amplificação em apenas um passo de amplificação.

A análise efetuada englobou o estudo de 462 carraças; 398 fêmeas distribuídas por 46 *pools* e quatro espécies, *Rh. sanguineus* (n=181), *Rh. bursa* (n=169), *De. marginatus* (n=39) e *Hy. marginatum* (n=8). Foram ainda analisados 64 machos, distribuídos por quatro *pools* e duas espécies, *Rh. sanguineus* (n=32) e *Rh. bursa* (n=32). A análise revelou no total uma frequência de deteção de 84%, resultado da positividade em 42 dos 50 extratos analisados. Os extratos que revelaram a presença de sequências genômicas do segmento L do genoma dos *Phlebovirus* eram essencialmente de carraças da espécie *Rh. sanguineus* (22 extratos positivos) e *Rh. bursa* (17 extratos positivos). Apenas três extratos de *De. marginatus* revelaram-se positivos para deteção de *Phlebovirus*, não tendo sido detetadas sequências destes vírus em extratos de *Hy. marginatum*. Contudo, esta aparente maior prevalência de flebovírus em carraças destas duas espécies poderá ser consequência do enviesamento introduzido pela representação de cada espécie no estudo (*Rh. sanguineus* (46,1%), *Rh. bursa* (43,5%), *De. marginatus* (8,4%) e *Hy. marginatum* (1,7%)).

Quando ambos os rastreios de flebovírus são analisados comparativamente, verificámos que dois dos extratos analisados (19 e 40), para o qual foram obtidos produtos de amplificação quando foram usados os conjuntos de *primers* internos desenhados para este estudo, não foi identificado como positivo quando analisado com o conjunto de *primers* ppL1 e ppL2 descritos por Matsuno e colaboradores (31). Tal observação parece, mais uma vez, sugerir que pelo menos algumas das deteções realizadas com os *primers* desenhados no decurso deste trabalho provavelmente corresponderiam a falsos positivos de amplificação. Não tendo sido possível testar a real especificidade de todos os *primers* desenhados, foi realizado um ensaio usando um extrato de isolado do vírus SFNV.

Discussão e Conclusões

Na generalidade, os *primers* descritos por Matsuno e colaboradores (31) demonstraram ser mais sensíveis, dado que permitiram a obtenção de produtos de amplificação, na sua maioria abundantes, ao final de apenas um ciclo de PCR. Ao tentar cobrir a grande diversidade genética que caracteriza este género de vírus, por via do aumento da degenerescência dos *primers*, dificultou-se o rastreio. De facto, os níveis de degeneração dos *primers* utilizados [PhlebAll_F1 (288), PhlebAll_R1 (432), Bhanj_F2 (16), SFTSV_F2(24), e UukcPhle_F2 (216))] ultrapassaram, em muitos casos, largamente o limite máximo de degenerescência aconselhado (256) (65). Contrariamente a esta abordagem, os *primers* descritos por Matsuno e colaboradores (31) utilizam nucleótidos com Inosinas aliadas à degeneração convencional e, desta forma, minimizam o nível de degenerescência. Muito provavelmente, as condições de PCR pouco restritivas, aliada ao grande nível de degenerescência dos *primers* utilizados, deverá certamente ter contribuído para aumentar a probabilidade de amplificações inespecíficas e conduzir a falsos positivos de amplificação. À semelhança deste, sugere-se que o mesmo poderá ter acontecido no rastreio efetuado para *Thogotovirus*, e neste caso, para além dos eventuais problemas associados à degeneração dos *primers* e à complexidade da amostra inicial, alia-se a limitação na disponibilidade, nas bases de dados, de sequências que pudessem ter sido usadas como referência (tendo em vista o desenho de *primers*). Este problema adicional levanta a possibilidade de que os *primers* utilizados, ainda que degenerados, não permitam a amplificação de eventuais novos togotovírus, por desajuste das suas sequências. Alternativamente, estes, simplesmente, não estiveram presentes nos macerados analisados, sendo que os produtos obtidos corresponderam a amplificações de sequências de origem desconhecida.

As relações filogenéticas das 23 sequências obtidas na sequência das amplificações específicas realizadas com recurso ao conjunto de *primers* ppL1 e ppL2 foram inferidas com base na construção de árvores filogenéticas. Para tal, foram construídos alinhamentos múltiplos das sequências nucleotídicas em questão, conjuntamente com sequências de referência de *Phlebovirus* (ver Anexo III). Uma árvore incluiu 104 sequências de referência, que representam a maioria dos *Phlebovirus* conhecidos, e foi construída pelo método junção de vizinhos (NJ), em que a matriz de

Discussão e Conclusões

distâncias genéticas corrigida utilizou o modelo de substituição Kimura 2-Parâmetros. Uma segunda árvore foi elaborada com base na análise de 42 sequências de referência, representando as grandes linhagens de *Phlebovirus*, e para tal foi utilizado o critério de máxima verosimilhança (ML). Ambas demonstraram a segregação das sequências analisadas em duas linhagens distintas, partilhando o mesmo ancestral comum. Uma das linhagens, na qual se inclui 22 das 23 sequências analisadas, que forma um grupo monofilético com o recentemente descoberto *Phlebovirus* Antigone2 (35) é constituída por todas as sequências provenientes de extratos de carraças do género *Rhipicephalus*. A segunda linhagem revelou ser constituída apenas pela única sequência analisada proveniente de um extrato de carraças *De. marginatus*, formando um grupo monofilético com a sequência representada por *Tacheng Tick Virus*. Estas relações revelaram-se consistentes entre si em ambas as árvores construídas com base em métodos e modelos diferentes, suportando assim a singularidade genética das linhagens virais detetadas.

Com base nos diferentes rastreios moleculares efetuados foram selecionados aleatoriamente extratos indicativos da potencial presença de sequências virais, tendo os respetivos sobrenadantes dos macerados seguido para uma tentativa de isolamento viral em linhas celulares Vero E6. Foram realizadas duas passagens cegas, as quais tiveram a duração de uma semana cada. As culturas de células Vero E6 expostas a alíquotas dos macerados (8, 10, 19, 23, 24, 40, 50, 51, 68, 70, e 72), evidenciaram em todos os casos efeito citopático no final da primeira passagem. Na primeira passagem apenas duas culturas apresentavam efeito citopático ligeiro, sendo que na última não foi observado CPE em nenhuma das culturas inoculadas. A ausência de CPE nas culturas celulares é frequentemente indicativa de que nenhum vírus estaria presente no inóculo utilizado, ou, caso estejam, como foi o caso dos macerados analisados, não conseguem replicar nas células em questão. Desta forma, a avaliação do CPE só por si, não é conclusiva relativamente à presença/ausência de vírus nas culturas inoculadas, tendo sido realizada uma análise complementar quer no inóculo (analisado após o período de adsorção), quer em parte das amostras colhidas ao final de cada passagem e controlos negativos correspondendo a células não infetadas.

Discussão e Conclusões

Após o rastreio molecular com recurso ao conjunto de *primers* ppL1 e ppL2, constatou-se a amplificação de sequências do segmento L de *Phlebovirus* nos inóculos e sobrenadantes ao fim de uma semana após inoculação (em dois dos casos também ao fim da primeira passagem), não tendo sido detetadas sequências virais de *Phlebovirus* nas segundas passagens. Desta forma, foi possível apurar que a diminuição do CPE ao longo do tempo foi acompanhada por uma diminuição da abundância dos produtos de amplificação, correspondentes à presença de genomas de *Phlebovirus* no meio de cultura. Pelas evidências apresentadas quer pelo rastreio molecular dos sobrenadantes de cultura, quer pela observação da perda de CPE ao longo das passagens efetuadas, depreende-se que os vírus detetados não têm a capacidade de infectar prontamente células Vero E6, sendo assim possível que os CPE inicialmente registados tenham resultado de alterações fisiológicas decorrentes do contacto das células com os macerados de carraças. Por outro lado, na primeira semana alguns efeitos apareceram apenas no sexto dia, fortalecendo a possibilidade de, em alguns casos, o CPE estar associado à replicação de vírus, uma vez que sendo a observação exclusivamente decorrente da toxicidade dos macerados, os efeitos deveriam observar-se pouco tempo depois de expor as células a estes. Futuramente, de forma a esclarecer a origem dos efeitos citopáticos apresentados, poderia expor-se as linhas celulares a macerados que tinham sido detetados como negativos, e verificar se eram semelhantes, desta forma era possível identificar se os efeitos apresentados estavam simplesmente associados à exposição das células a componentes nocivos presentes nos macerados, ou à presença de vírus.

Embora as células Vero E6 sejam frequentemente utilizadas como hospedeiras para a replicação de inúmeros vírus, nem sempre é possível o isolamento viral nestas. Idealmente, as tentativas de isolamento não se devem restringir apenas a um sistema biológico, devendo ser utilizadas abordagens complementares para aumentar a probabilidade de isolamento. Desta forma, o isolamento viral foi adicionalmente tentado em linhas celulares DH82, para o qual foram seleccionados dois *pools* (55 e 74). As culturas foram sujeitas às mesmas condições, ou seja, duas passagens cegas após uma adsorção inicial de 1 a 2 horas, com a duração de uma semana cada. No final de cada passagem observou-se a grande maioria das células descoladas da monocamada do

Discussão e Conclusões

suporte e formando grandes agregados celulares (efeito observado até à terceira passagem). A realização de um ensaio de deteção de sequências virais de *Phlebovirus* no inóculo e sobrenadantes de cultura revelou a presença de genomas de flebovírus apenas no inóculo, não tendo sido detetadas em nenhum dos sobrenadantes de cultura, o que, mais uma vez, parece indicar a incapacidade destes vírus em replicar em células DH82 (pelo menos nas condições em que o ensaio foi realizado). O efeito apresentado nas culturas pode ser relativo ao facto de ser aconselhado a troca do meio das culturas de linhas celulares DH82 entre dois a três dias (81), o que não aconteceu, uma vez que cada passagem teve a duração de uma semana. Esta possibilidade é sustentada ainda pela observação de um CPE difuso nas culturas controlo.

Conclui-se então que os vírus detetados não têm a capacidade de infectar prontamente tanto células Vero E6 como células DH82. A possibilidade das sequências detetadas representarem elementos virais endógenos integrados no genoma do hospedeiro é descartada uma vez que foram efetuados controlos onde foi garantido que os produtos obtidos foram amplificados a partir de cDNA (origem RNA). Apesar destes vírus não terem a capacidade de infectar prontamente as linhas celulares testadas, é fortemente sugerido pelos controlos realizados, que as sequências obtidas foram amplificadas a partir de RNA viral encapsidado em virões (forma infecciosa). Eventualmente, pela incapacidade de replicação em duas linhas de células de vertebrados põem-se a hipótese de representar um vírus específico de carraças. Vírus específicos de insetos são muito comuns, no entanto, até à data, apenas foi descrito um vírus específico de carraças, o qual foi designado de *St. Croix River Virus* (82,83). A tentativa de isolamento em linhas celulares de carraças seria a melhor aposta, no entanto não foi possível a sua realização devido aos custos inerentes, assim como a problemas logísticos devido ao facto destas linhas terem um crescimento lento, o que obrigava a um prolongamento do protocolo de isolamento por um período de tempo muito longo.

A fim de identificar a presença de vírus em carraças recolhidas em Portugal recorreu-se a uma abordagem que não necessitava de um conhecimento prévio das sequências virais a amplificar. Desta forma, a sua aplicação deveria permitir uma análise comparativa de duas abordagens diferentes aplicadas à pesquisa de vírus. A

Discussão e Conclusões

técnica através da qual se realizou esta abordagem, designada de SISPA, foi descrita pela primeira vez em 1991 por Reyes (69), tendo vindo a ser desenvolvida e adaptada ao longo dos anos. Inicialmente, foi realizada partindo da fração líquida de dois macerados de carraças identificados por 20 e 56, que originaram produtos de amplificação. Contudo, não foi possível observar bandas definidas devido ao “barulho de fundo”. Este poderá ser resultado da ocorrência de amplificações não-específicas de ácidos nucleicos contaminantes (mesmo após o pré-tratamento efetuado para enriquecimento das amostras a analisar em ácidos nucleicos encapsulados). Dessa forma, foi ainda realizada a técnica partindo do sobrenadante de cultura da primeira semana do conjunto dos macerados 68, 70 e 72 em células Vero E6, uma vez que o sobrenadante era menos complexo. O resultado obtido foi um pouco mais limpo que o anterior (menos amplificações não-específicas), no entanto continuou a não ser possível a observação de amplicões isolados. De notar que, apesar do sobrenadante de cultura contendo eventuais vírus ser uma amostra menos complexa que um macerado de um conjunto de artrópodes, o não isolamento em cultura poderá estar relacionado com uma menor concentração de eventuais vírus do que inicialmente presentes no macerado inicial. Os resultados obtidos impossibilitaram a purificação de bandas para subsequente sequenciação e clonagem, tendo por isso sido utilizado diretamente na clonagem molecular num vetor plasmídico o produto obtido na PCR de SISPA dos macerados 20 e 56. As amplificações obtidas a partir do sobrenadante de cultura dos macerados 68, 70 e 72, apesar de ligeiramente menos ricas em amplicões não-específicos, não revelaram diferenças significativas relativamente às que foram obtidas quando a técnica foi aplicada diretamente a macerados, pelo que, por uma gestão de tempo e recursos, optou-se por não prosseguir para a etapa de clonagem. Após a sequenciação dos clones plasmídicos recombinantes e análise das sequências obtidas constatou-se que representavam, na sua maioria, moléculas de DNA plasmídico com insertos correspondentes às sequências codificantes de RNA ribossomais ou RNA mensageiros de origem celular, não tendo qualquer das 11 sequências analisadas apresentado homologies com sequências de genomas virais. Este resultado não era espetável, uma vez que, após o pré-tratamento efetuado com recurso a centrifugação, filtração e tratamento com DNase e RNase de modo a remover e degradar ácidos nucleicos

Discussão e Conclusões

contaminantes (não virais), teoricamente o extrato deveria estar limpo de contaminantes e enriquecido em genomas virais encapsidados (não degradados por DNase e RNase adicionadas exogenamente). No entanto, o pré-tratamento realizado não se revelou eficaz, pois após a clonagem dos produtos amplificados e análise das sequências obtidas verificou-se ser produto de amplificações de contaminantes e não de sequências virais. Pelas características do método utilizado (SISPA), a purificação e enriquecimento viral são fatores determinantes para o seu sucesso, sendo que na literatura são várias vezes referenciadas como técnicas de enriquecimento viral a sedimentação prévia de partículas por ultracentrifugação e a sua purificação por ultracentrifugação em gradiente de densidade usando sacarose, iodixanol ou cloreto de cério (65,70). Infelizmente, não foi possível a utilização de qualquer destas abordagens. Num estudo efetuado utilizando a técnica SiSPA, todos os 12 clones sequenciados apresentavam sequências virais (84) evidenciando tratar-se de uma técnica bastante eficiente, contrariamente ao resultado obtido neste estudo.

Apesar das vantagens associadas a SISPA, nomeadamente o facto de ser possível a identificação de sequências virais desconhecidas presente em quantidades limitadas e independente do isolamento prévio de vírus em cultura (67), este método não se revelou eficaz quando não é possível eliminar os contaminantes (ácidos nucleicos não-virais) das amostras a analisar. Mesmo que a maior parte dos ácidos nucleicos contaminantes tenha sido removida por centrifugação, filtração e tratamento com DNase e RNase, este procedimento não se verificou ser o suficiente para, no presente estudo, permitir a obtenção de amplicões abundantes de origem viral. Embora as técnicas de PCR convencionais combinadas com a utilização de *primers* degenerados, imponham limitações à descoberta de novos vírus, podem revelar uma maior sensibilidade e especificidade do que SISPA quando o pré-tratamento das amostras a analisar não é efetuado com sucesso e os contaminantes não são removidos. Nestas circunstâncias, torna-se preferível a utilização de *primers* degenerados e técnicas de PCR convencionais quando se pretende detetar genomas virais.

Apesar deste estudo essencialmente de carácter qualitativo, destinado a identificar a presença de sequências virais em carraças colhidas em Portugal, sem a

Discussão e Conclusões

avaliação da predominância de regiões, espécies ou estádios de desenvolvimento, foi notória a detecção de sequências virais na sua grande maioria provenientes de macerados do género *Rhipicephalus* (espécies *Rh. sanguineus* e *Rh. bursa*). Verificou-se também que a identificação de sequências virais contemplou todos os locais de recolha, ou seja, foram detetadas sequências virais de *Phlebovirus* em carraças recolhidas na Herdade da Ribeira Abaixo, EVOA e nas povoações da Comporta, Carrasqueira e Alcácer do Sal. Ainda que apenas tenham sido incluídas neste estudo carraças adultas recolhidas da vegetação, nas quais se detetou a presença de flebovírus tanto em fêmeas como em machos, um outro trabalho desenvolvido paralelamente por um colega que incidia sobre o estudo de carraças em todos os estádios de desenvolvimento (larva, ninfa e adulto) recolhidas em animais, quando analisadas com os mesmos conjuntos de *primers* (ppL1 e ppL2) revelou que a detecção de sequências virais apenas em carraças adultas, não tendo sido detetadas em larvas ou ninfas(77). No entanto, estes resultados são apenas preliminares e carecem de uma análise mais cuidada, incluindo uma pesquisa exaustiva dos vírus detetados nas formas imaturas. A possibilidade destes vírus serem presumivelmente adquiridos pelas carraças (fêmeas e machos) no decurso do seu desenvolvimento, através da alimentação a partir de um hospedeiro vertebrado, uma vez que não são detetados nos estádios imaturos, deverá ser investigada em estudos futuros. Apesar da manutenção na natureza da maioria dos vírus transmitidos por carraças se dever, essencialmente, à transmissão transovárica e transtadial (4), neste caso as evidências apresentadas sugerem que não sejam transmitidos transovariamente nem entre estádios de desenvolvimento. A hipótese dos vírus serem adquiridos no decurso do ciclo de vida das carraças refuta a possibilidade de representarem vírus específicos de carraças, sugerida anteriormente pela incapacidade destes vírus de replicarem em células Vero E6 e DH82. É, no entanto, desconhecido se ocorre transmissão através da co-alimentação entre carraças infectadas e não-infectadas.

Num contexto de perspectivas futuras, destaca-se a necessidade de se realizarem novas tentativas de isolamento, em diferentes linhas celulares, provenientes quer de hospedeiros vertebrados quer de carraças, uma vez que a obtenção de um sobrenadante de cultura enriquecido com estes vírus em particular, permite, entre outros, estudos de dinâmica de replicação viral, avaliação da complexidade das espécies que

Discussão e Conclusões

eventualmente formem, e definição das gamas de potenciais hospedeiros. A natureza, ciclo de transmissão biológica e patogenicidade permanecem também desconhecidos, suspeitando-se que a infecção de ixodídeos ocorra através da alimentação destes num hospedeiro durante o desenvolvimento, uma vez que não foram encontrados vírus em estádios imaturos (77). Além disso, a detecção de diferentes linhagens genéticas de vírus na mesma área geográfica, oferece a possibilidade de ocorrência de trocas de segmentos (ou outros rearranjos genéticos implicando recombinação), uma vez que estes vírus possuem um genoma segmentado, podendo induzir alterações fenotípicas causadas pelas novas combinações dos segmentos virais (85), e desta forma ser uma fonte de potenciais agentes infecciosos patogênicos para humanos e animais.

Referências Bibliográficas

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

1. Baneth G. Tick-borne infections of animals and humans: A common ground [Internet]. International Journal for Parasitology. 2014. p. 591–6. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpara.2014.03.011>
2. Gary R. Mullen LAD. Medical and Veterinary Entomology. 2009. 485 p.
3. Bell-Sakyi L, Attoui H. Endogenous tick viruses and modulation of tick-borne pathogen growth. Front Cell Infect Microbiol [Internet]. 2013;3(July):25. Obtido de: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3709243&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>
4. Estrada-Peña A, De La Fuente J. The ecology of ticks and epidemiology of tick-borne viral diseases. Antiviral Res. 2014;108:104–28.
5. Labuda M, Nuttall P a. Tick-borne viruses. Parasitology. 2004;129 Suppl:S221–45.
6. Silva MM, Santos AS, Formosinho P, Bacellar F. Carraças associadas a patologias infecciosas em Portugal. Acta Medica Portuguesa. 2006. p. 39–48.
7. Nuttall PA. Molecular characterization of tick-virus interactions. Front Biosci. 2009;14:2466–83.
8. Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac. Relatório REVIVE 2013 - Culicídeos e Ixodídeos: Rede de Vigilância de Vetores e Ixodídeos. 2014.
9. Centro de Estudos de Vetores e Doenças Infeciosas Doutor Francisco Cambournac. REVIVE 2011 - 2015 Culicídeos e Ixodídeos. 2016.
10. Hubálek Z, Rudolf I. Tick-borne viruses in Europe. Parasitology Research. 2012. p. 9–36.
11. Süss J. Tick-borne encephalitis 2010: Epidemiology, risk areas, and virus strains in Europe and Asia -An overview. Ticks Tick Borne Dis. 2011;2:2–15.

Referências Bibliográficas

12. Mertens M, Schmidt K, Ozkul A, Groschup MH. The impact of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus on public health. *Antiviral Res.* 2013;98:248–60.
13. Filipe AR, Alves MJ, Karabatsos N, de Matos AP, Nuncio MS, Bacellar F. Palma virus, a new bunyaviridae isolated from ticks in Portugal. *Intervirology* [Internet]. 1994;37(6):348–51. Obtido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8586533>
14. Gubler DJ. The global emergence/resurgence of arboviral diseases as public health problems. Em: *Archives of Medical Research.* 2002. p. 330–42.
15. Bichaud L, de Lamballerie X, Alkan C, Izri A, Gould EA, Charrel RN. Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microb Pathog* [Internet]. Elsevier Ltd; 2014;77:136–41. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2014.09.002>
16. Achenbach JE, Gallardo C, Nieto-Pelegri E, Rivera-Arroyo B, Degefa-Negi T, Arias M, et al. Identification of a New Genotype of African Swine Fever Virus in Domestic Pigs from Ethiopia. *Transbound Emerg Dis* [Internet]. 2016;(Efsa 2015). Obtido de: <http://doi.wiley.com/10.1111/tbed.12511>
17. Hartemink N, Takken W. Trends in tick population dynamics and pathogen transmission in emerging tick-borne pathogens in Europe: an introduction. *Exp Appl Acarol* [Internet]. Springer International Publishing; 2016;68(3):269–78. Obtido de: "<http://dx.doi.org/10.1007/s10493-015-0003-4>
18. Valarcher JR, Hägglund S, Juremalm M, Blomqvist G, Renström L, Zohari S, et al. Tick-borne encephalitis. *OIE Rev Sci Tech* [Internet]. 2015;34(2):453–66. Obtido de: <http://www.scopus.com/inward/record.url?eid=2-s2.0-84945279822&partnerID=40&md5=d510e56d1ee31fb85aa4ec09fe1b8f25>
19. Papa A, Mirazimi A, Köksal I, Estrada-Pena A, Feldmann H. Recent advances in research on Crimean-Congo hemorrhagic fever. *J Clin Virol.* 2015;64:137–43.
20. Whitehouse CA. Crimean-Congo hemorrhagic fever. *Antiviral Res.* 2004;64(3):145–60.

Referências Bibliográficas

21. Bente DA, Forrester NL, Watts DM, McAuley AJ, Whitehouse CA, Bray M. Crimean-Congo hemorrhagic fever: History, epidemiology, pathogenesis, clinical syndrome and genetic diversity. *Antiviral Res. Elsevier B.V.*; 2013;100(1):159–89.
22. EFE A. Espanha confirma 2 casos de «Febre Hemorrágica da Crimeia-Congo» [Internet]. [citado 6 de Setembro de 2016]. Obtido de: <http://g1.globo.com/ciencia-e-saude/noticia/2016/09/espanha-confirma-2-casos-de-febre-hemorragica-da-crimeaia-congo.html>
23. Filipe AR, Calisher CH LJ. Antibodies to Congo-Crimean haemorrhagic fever, Dhorì, Thogoto and Bhanja viruses in southern Portugal.No Title. *Acta Virol.* 1985;
24. Maltezou HC, Papa A. CrimeaneCongo hemorrhagic fever: Risk for emergence of new endemic foci in Europe? *Travel Med Infect Dis* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;8(3):139–43. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tmaid.2010.04.008>
25. Ruzek D, Yakimenko V V., Karan LS, Tkachev SE. Omsk haemorrhagic fever. *Lancet* [Internet]. Elsevier Ltd; 2010;376(9758):2104–13. Obtido de: [http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(10\)61120-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(10)61120-8)
26. Charrel RN, Attoui H, Butenko AM, Clegg JC, Deubel V, Frolova T V, et al. Tick-borne virus diseases of human interest in Europe. *Clin Microbiol Infect.* 2004;10(12):1040–55.
27. Raval M, Singhal M, Guerrero D, Alonto A. Powassan virus infection: case series and literature review from a single institution. *BMC Res Notes.* 2012;5(1):594.
28. Kosoy OI, Lambert AJ, Hawkinson DJ, Pastula DM, Goldsmith CS, Charles Hunt D, et al. Novel Thogotovirus associated with febrile illness and death, united states, 2014. *Emerg Infect Dis.* 2015;21(5):760–4.
29. Filipe AR, CasaIs J. Isolation of Dhorì Virus from *Hyalomma marginatum* Ticks

Referências Bibliográficas

- in Portugal. Intervirology. 1979;11:124–7.
30. Filipe AR, Calisher CH. Isolation of Thogoto virus from ticks in Portugal. Acta Virol. 1984;28(2):152–5.
31. Matsuno K, Weisend C, Kajihara M, Matysiak C, Williamson BN, Simuunza M, et al. Comprehensive molecular detection of tick-borne phleboviruses leads to the retrospective identification of taxonomically unassigned bunyaviruses and the discovery of a novel member of the genus phlebovirus. J Virol. 2015;89(1):594–604.
32. Xia H, Hu C, Zhang D, Tang S, Zhang Z, Kou Z, et al. Metagenomic profile of the viral communities in Rhipicephalus spp. ticks from Yunnan, China. PLoS One. 2015;
33. Yu XJ, Liang MF, Zhang SY, Liu Y, Li JD, Sun YL, et al. Fever with Thrombocytopenia Associated with a Novel Bunyavirus in China. N Engl J Med. 2011;1523–32.
34. Savage HM, Godsey MS, Amy L, Panella NA, Burkhalter KL, Harmon JR, et al. First detection of heartland virus (bunyaviridae: Phlebovirus) from field collected arthropods. Am J Trop Med Hyg. 2013;89(3):445–52.
35. Papa A, Kontana A, Tsioka K, Chaligiannis I, Sotiraki S. Novel phleboviruses detected in ticks, Greece. Ticks Tick Borne Dis [Internet]. Elsevier GmbH.; 2014;2–5. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ttbdis.2016.02.017>
36. Elliott RM, Brennan B. Emerging phleboviruses. Curr Opin Virol [Internet]. 2014;5(1):50–7. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2014.01.011>
37. CR Pringle. Virus Taxonomy 1996 - A Bulletin from the Xth International Congress of Virology in Jerusalem (PDF) , International Committee on Taxonomy of Viruses. International Committee on Taxonomy of Viruses.
38. Presti RM, Zhao G, Beatty WL, Mihindukulasuriya KA, Travassos APA, Rosa D, et al. Quarantfil, Johnston Atoll, and Lake Chad Viruses Are Novel Members

Referências Bibliográficas

- of the Family Orthomyxoviridae. J Virol. 2009;83(22):11599–606.
39. Smith DB, Gaunt ER, Digard P, Templeton K, Simmonds P. Detection of influenza C virus but not influenza D virus in Scottish respiratory samples. J Clin Virol. 2016;74:50–3.
40. South Dakota State University. New virus gets official name, influenza D [Internet]. ScienceDaily. 2016 [citado 22 de Setembro de 2016]. Obtido de: www.sciencedaily.com/releases/2016/09/160901140433.htm
41. Bussetti AV, Palacios G, da Rosa AT, Savji N, Jain K, Guzman H, et al. Genomic and antigenic characterization of Jos virus. J Gen Virol. 2012;93(2).
42. ViralZone. Thogotovirus [Internet]. 2016. Obtido de: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/79.html
43. Morse MA, Marriott AC, Nuttall PA. The glycoprotein of Thogoto virus (a tick-borne orthomyxo-like virus) is related to the baculovirus glycoprotein GP64. Virology. 1992;186(2):640–6.
44. Pinto Da Silva E V., Travassos Da Rosa APA, Nunes MRT, Diniz JAP, Tesh RB, Cruz ACR, et al. Araguari virus, a new member of the family Orthomyxoviridae: Serologic, ultrastructural, and molecular characterization. Am J Trop Med Hyg. 2005;73(6):1050–8.
45. Davies CR, Jones LD, Green BM, Nuttall PA. In vivo reassortment of Thogoto virus (a tick-borne influenza-like virus) following oral infection of Rhipicephalus appendiculatus ticks. J Gen Virol. 1987;68.
46. Frese M, Weeber M, Weber F, Speth V, Haller O. Mx1 sensitivity : Batken virus is an orthomyxovirus closely related to Dhori virus. J Gen Virol. 1997;78:2453–8.
47. Briese T, Chowdhary R, Travassos da Rosa A, Hutchison SK, Popov V, Street C, et al. Upolu virus and Aransas Bay virus, two presumptive bunyaviruses, are novel members of the family Orthomyxoviridae. J Virol. 2014;88(10):5298–309.

Referências Bibliográficas

48. Lambert AJ, Velez JO, Brault AC, Calvert AE, Bell-Sakyi L, Bosco-Lauth AM, et al. Molecular, serological and in vitro culture-based characterization of Bourbon virus, a newly described human pathogen of the genus Thogotovirus. *J Clin Virol.* 2015;73:127–32.
49. Liu DY, Tesh RB, Travassos da Rosa APA, Peters CJ, Yang Z, Guzman H, et al. Phylogenetic relationships among members of the genus Phlebovirus (Bunyaviridae) based on partial M segment sequence analyses. *Journal of General Virology.* 2003. p. 465–73.
50. ViralZone. Phlebovirus [Internet]. 2016. Obtido de: http://viralzone.expasy.org/all_by_species/252.html#tab6
51. Barroso Helena, Antonio Meliço-Silvestre NT. *Microbiologia Médica Volume 2.* 2014. 210-213 p.
52. Palacios G, Savji N, Travassos da Rosa A, Guzman H, Yu X, Desai A, et al. Characterization of the Uukuniemi virus group (Phlebovirus: Bunyaviridae): evidence for seven distinct species. *J Virol.* 2013;87(6).
53. McMullan LK, Folk SM, Kelly AJ, MacNeil A, Goldsmith CS, Metcalfe MG, et al. A New Phlebovirus associated with severe febrile illness in Missouri. *N Engl J Med.* 2012;367(9):834–41.
54. Mourya DT, Yadav PD, Basu A, Shete A, Patil DY, Zawar D, et al. Malsoor virus, a novel bat phlebovirus, is closely related to severe fever with thrombocytopenia syndrome virus and heartland virus. *J Virol.* 2014;88(6):3605–9.
55. Wang J, Selleck P, Yu M, Ha W, Rootes C, Gales R, et al. Novel phlebovirus with zoonotic potential isolated from ticks, Australia. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(6):1040–3.
56. Dilcher M, Alves MJ, Finkeisen D, Hufert F, Weidmann M. Genetic characterization of bhanja virus and palma virus, two tick-Borne phleboviruses.

Referências Bibliográficas

- Virus Genes. 2012;45(2):311–5.
57. Matsuno K, Weisend C, Travassos da Rosa APA, Anzick SL, Dahlstrom E, Porcella SF, et al. Characterization of the Bhanja serogroup viruses (Bunyaviridae): a novel species of the genus Phlebovirus and its relationship with other emerging tick-borne phleboviruses. J Virol [Internet]. 2013;87(7):3719–28. Obtido de: <http://jvi.asm.org/cgi/content/long/87/7/3719>
58. Swei A, Russell BJ, Naccache SN, Kabre B, Veeraraghavan N, Pilgard MA, et al. The Genome Sequence of Lone Star Virus, a Highly Divergent Bunyavirus Found in the Amblyomma americanum Tick. PLoS One. 2013;8(4).
59. Lvov DK, Gromashevsky VL, Zakaryan VA, Skvortsova TM, Berezina LK, Gofman YP, et al. Razdan virus, a new ungrouped bunyavirus isolated from Dermacentor marginatus ticks in Armenia. Acta Virol. 1978;22(6):506–8.
60. Al'khovskii SV , L'vov DK , Shchelkanov MIu , Shchetinin AM , Krasnoslobodtsev KG , Deriabin PG , Samokhvalov EI , Botikov AG ZV. [Molecular-genetic characterization of the Bhanja virus (BHAV) and the Razdan virus (RAZV) (Bunyaviridae, Phlebovirus) isolated from the Ixodes ticks Rhipicephalus bursa (Canestrini and Fanzago, 1878) and Dermacentor marginatus (Sulzer, 1776) in transcauc. Vopr Virusol. 2013;58(4):14–9.
61. Mokili JL, Rohwer F, Dutilh BE. Metagenomics and future perspectives in virus discovery. Curr Opin Virol [Internet]. Elsevier B.V.; 2012;2(1):63–77. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.12.004>
62. Firth C, Lipkin WI. The Genomics of Emerging Pathogens. Annu Rev Genomics Hum Genet. 2013;14:281–300.
63. Ahmed Hadidi, Ricardo Flores, John Randles JS. Viroids: Properties, Detection, Diseases and their Control. 2003. 115-116 p.
64. N.Barroso Helena, Antonio Meliço- Silvestre NT. Microbiologia Médica Volume 1. 2014. 185-192 p.

Referências Bibliográficas

65. Bexfield N, Kellam P. Metagenomics and the molecular identification of novel viruses. *Vet J* [Internet]. Elsevier Ltd; 2011;190(2):191–8. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.10.014>
66. Preston GM. Use of Degenerate Oligonucleotide Primers and the Polymerase Chain Reaction to Clone Gene Family Members. *PCR Protoc* [Internet]. 1993;15:317–37. Obtido de: <http://dx.doi.org/10.1385/0-89603-244-2:317>
67. Wen Y-M, Wang Y-X. Biological features of hepatitis B virus isolates from patients based on full-length genomic analysis. *Rev Med Virol*. 2009;19(1):57–64.
68. Delwart EL. Viral metagenomics. *Reviews in Medical Virology*. 2007. p. 115–31.
69. Reyes GR, Kim JP. Sequence-independent, single-primer amplification (SISPA) of complex DNA populations. *Mol Cell Probes* [Internet]. Dezembro de 1991 [citado 16 de Fevereiro de 2016];5(6):473–81. Obtido de: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0890850805800209>
70. Djikeng A, Halpin R, Kuzmickas R, Depasse J, Feldblyum J, Sengamalay N, et al. Viral genome sequencing by random priming methods. *BMC Genomics*. 2008;9:5.
71. Marston DA, McElhinney LM, Ellis RJ, Horton DL, Wise EL, Leech SL, et al. Next generation sequencing of viral RNA genomes. *BMC Genomics* [Internet]. 2013;14(1):444. Obtido de: <http://bmcbgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-444>
72. Temmam S, Monteil-Bouchard S, Robert C, Pascalis H, Michelle C, Jardot P, et al. Host-Associated metagenomics: A guide to generating infectious RNA Viromes. *PLoS One*. 2015;10(10):1–21.
73. Katoh, K., Standley DM. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol*. 2013. p. 30, 772–

Referências Bibliográficas

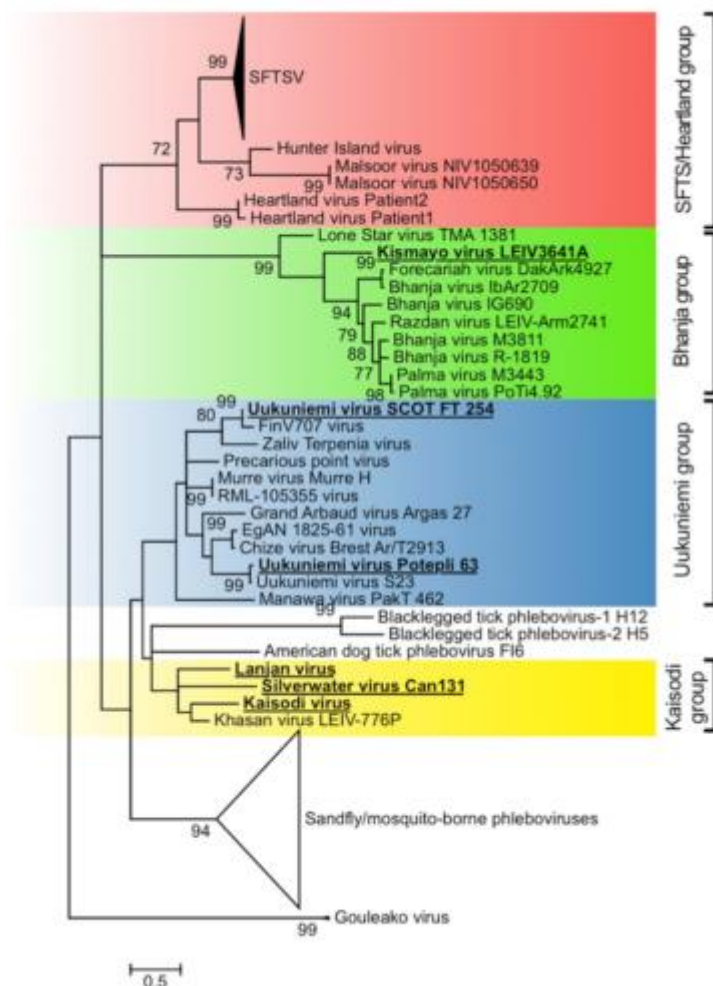
- 780.
74. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. Nucl. Acids. Symp. Ser. 1999. p. 41:95-98.
75. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar S. MEGA6 : molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. Mol. Biol. Evol. 2013. p. 30, 2725–2729.
76. D. Posada. jModelTest: phylogenetic model averaging. Mol Biol Evol; 2008. p. 25(7):1253-6.
77. Pereira André. Mestrado Integrado em Medicina Veterinária, da Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias Detecção molecular de agentes infecciosos transmitidos por ixodídeos obtidos de animais silvestres e domésticos, em Portugal. 2016.
78. Amaro F, Zé-Zé L, Alves MJ, Börstler J, Clos J, Lorenzen S, et al. Co-circulation of a novel phlebovirus and Massilia virus in sandflies, Portugal. Virol J [Internet]. 2015;12(1):174. Obtido de: <http://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-015-0407-0>
79. Amaro F, Hanke D, Zé-Zé L, Alves MJ, Becker SC, Höper D. Genetic characterization of Arrabida virus, a novel phlebovirus isolated in South Portugal. Virus Res. 2016;214:19–25.
80. Endoh D, Mizutani T, Kirisawa R, Maki Y, Saito H, Kon Y, et al. Species-independent detection of RNA virus by representational difference analysis using non-ribosomal hexanucleotides for reverse transcription. Nucleic Acids Res. 2005;33(6):1–11.
81. DH82 (ATCC® CRL-10389™) [Internet]. [citado 27 de Agosto de 2016]. Obtido de: https://www.lgcstandards-atcc.org/products/all/CRL-10389.aspx?geo_country=pt#culturemethod

Referências Bibliográficas

82. Pilar Alberdi & M, Dalby MJ, Rodriguez-Andres J, Fazakerley JK, Kohl A, Bell-Sakyi L. Detection and identification of putative bacterial endosymbionts and endogenous viruses in tick cell lines. *Ticks Tick Borne Dis.* 2012;3:137–46.
83. Nuttall PA. Molecular characterization of tick-virus interactions. *Front Biosci* [Internet]. 2009;14(3):2466–83. Obtido de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19273212>
84. Allander T, Emerson SU, Engle RE, Purcell RH, Bukh J. A virus discovery method incorporating DNase treatment and its application to the identification of two bovine parvovirus species. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(20):11609–14.
85. Gerrard SR, Li L, Barrett AD, Nichol ST. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. *J Virol* [Internet]. 2004;78(16):8922–6. Obtido de: <http://jvi.asm.org/content/78/16/8922.full>

6. ANEXOS

ANEXO I



Anexo 1 - Árvore filogenética de máxima verossimilhança, representativa dos grupos do género *Phlebovirus* transmitidos por carraças (Adaptado de (31))

ANEXO II

Macerado	N	Espécie	Localidade
M1	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M2	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M3	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M4	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M5	8	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M6	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M7	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M8	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M9	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M10	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M11	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Alcácer do Sal
M12	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Alcácer do Sal
M13	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Alcácer do Sal
M14	9	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Alcácer do Sal
M15	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M16	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M17	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M18	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M19	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M20	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M21	8	<i>Dermacentor marginatus</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M22	3	<i>Dermacentor marginatus</i>	Alcácer do Sal

M23	3	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Carrasqueira
M24	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Comporta
M25	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M26	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M27	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M28	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M29	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M30	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M31	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M32	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M33	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M34	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M35	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M36	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M37	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M38	8	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M39	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M40	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	EVOA
M41	6	<i>Hyalomma marginatum</i>	EVOA
M42	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M43	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M44	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M45	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M46	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M47	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M48	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M49	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo

M50	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M51	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M52	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M53	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M54	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M55	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M56	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Herdade da Ribeira Abaixo
M57	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M58	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M59	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M60	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M61	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M62	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M63	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M64	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M65	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M66	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M67	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M68	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M69	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M70	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M71	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M72	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M73	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M74	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M75	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M76	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA

M77	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M78	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M79	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M80	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M81*	16	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M82*	16	<i>Rhipicephalus bursa</i>	EVOA
M83*	16	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA
M84*	16	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	EVOA

Anexo 2 - Tabela relativa aos dados correspondentes aos macerados. N – número de indivíduos em cada pool

ANEXO III

Vírus (estirpe)	Origem Geográfica	Hospedeiro	Numero de acesso
Adana (195)	Turquia	<i>Phlebotomus</i> sp.	KJ939330
Aguacate	Panamá	<i>Lutzomyia</i> sp.	NC_015451
Alcube (S20)	Portugal	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	KR363190
Alenquer	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	HM119401
American dog tick phlebovirus (ADTPV-1)	EUA	<i>Dermacentor variabilis</i>	KJ746901
American dog tick phlebovirus (FI6)	EUA	<i>Dermacentor variabilis</i>	KM048311
Arbia (ISS PHL18)	Itália	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	JX472400
Ariquemes	Brasil	<i>Lutzomyia</i> sp.	HM119404
Arrabida (PoSFPhlebV/126/2008)	Portugal	<i>Phlebotomus</i> sp	KP863799
Arumowot	Espanha	ND*	NC_023635
Belterra (Be An 356637)	Brasil	<i>Proechimys longicaudatus</i>	EF076023
Bhanja (ibAr2709)	Nigéria	<i>Rhipicephalus decoloratus</i>	NC_027140
Bhanja (IG690)	Índia	<i>Haemaphysalis intermedia</i>	KC521440
Bhanja (M3811)	Portugal	ND*	JQ956376
Bhanja (R-1819)	EUA	<i>Homo sapiens</i>	JX961622
Blacklegged tick phlebovirus-1 (RTS1)	EUA	<i>Ixodes scapularis</i>	KJ746873
Blacklegged tick phlebovirus-2 (RTS2)	EUA	<i>Ixodes scapularis</i>	KJ746874
Bole Tick Virus 1 (BL075)	China	<i>Hyalomma asiaticum</i>	KM817664
Buenaventura (CoAr3319)	Colômbia	Sandfly**	KP272001
Chandiru	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	HM119407
Changping Tick Virus 1 (CP1-2)	China	<i>Dermacentor</i> sp.	KM817665
Chize (Brest Ar/T2913)	França	<i>Ixodes frontalis</i>	JF838324
Durania (Co Ar 171162)	Colômbia	<i>Lutzomyia</i> sp.	HM566155
Echarte	Peru	<i>Homo sapiens</i>	HM119410
EgAN 1825-61	ND*	ND*	HM566159
FinV707 (FinV707)	Noruega	<i>Ixodes uriae</i>	JQ924562
Forecariah (DakArk4927)	Guiné	<i>Rhipicephalus geigy</i>	JX961625
Gabek Forest (Sud AN 754-6)	Sudão	<i>Acomys cahirinus</i>	KF297903
Gouleako (A5/CI/2004)	Costa do Marfim	<i>Culex</i> sp.	HQ541738
Grand Arbaud (Argas 27)	França	<i>Argas reflexus</i>	JF838327
Heartland (Patient1)	EUA	<i>Homo sapiens</i>	NC_024495
Heartland (Patient2)	EUA	<i>Homo sapiens</i>	JX005847
Heartland (TN)	EUA	<i>Homo sapiens</i>	KJ740148
Heartland virus	ND*	ND*	JC047333
Heartland virus	ND*	ND*	JC047326
Huangpi Tick Virus 2 (H114-17)	China	<i>Haemaphysalis</i> sp.	KM817668
Hunter Island	Austrália	<i>Ixodes eudyptidis</i>	KF848980
Hunter Island (CSIRO1568)	Austrália	<i>Ixodes eudyptidis</i>	NC_027717
Itaituba	Brasil	<i>Didelphis marsupialis</i>	HM119416
Ixcanal (CA Ar 170897)	Guatemala	<i>Lutzomyia</i> sp.	HM566162
Jacunda	Brasil	<i>Myoprocta acouchy</i>	HM466934
Karimabad (91019-P)	Irão	<i>Phlebotomus papatasi</i>	KF297906
Karimabad (I-58)	Irão	<i>Phlebotomus</i> sp.	KF297912

Khasan (LEIV-776P)	Rússia	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	KF892046
Kismayo (LEIV3641A)	Somália	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	KM114252
Komandory (LEIV-13856)	Rússia	<i>Ixodes uriae</i>	KF892049
Lihan (LH-1)	China	<i>Rhipicephalus microplus</i>	KM817672
Lone Star (TMA 1381)	EUA	<i>Amblyomma americanum</i>	NC_021242
Maldonado (FMD 0077)	Peru	<i>Homo sapiens</i>	HM119413
Malsoor (NIV1050650)	India	<i>Rousettus leschenaultii</i>	KF186497
Manawa (PakT 462)	Paquistão	<i>Argas abdussalami</i>	JQ924565
Massilia (127)	Portugal	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	KT906098
Massilia (W)	França	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	EU725771
Medjerda Valley (T131)	Tunísia	<i>Phlebotomus</i> sp.	KU255114
Morumbi	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	HM119422
Mucura	Brasil	<i>Anopheles triannulatus</i>	HM119419
Munguba	ND*	ND*	HM566164
Murre (Murre H)	EUA	<i>Uria</i> sp.	JF838330
Naples (Yu 8/76)	Jugoslávia	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	JF920139
Nique	Panamá	<i>Lutzomyia panamensis</i>	HM119425
Palma (M3443)	Portugal	ND*	JQ956379
Palma (PoTi4.92)	Portugal	<i>Haemaphysalis punctata</i>	JX961628
Phlebovirus (GGP-2011a)	Venezuela	Sentinel hamster**	HM566185
Phlebovirus (JS24)	China	<i>Homo sapiens</i>	HQ830163
Phlebovirus (WCH/97/HN/China/2011)	China	<i>Homo sapiens</i>	JQ341188
Phlebovirus Antigone (Antigone2-Imathia1-Greece-2012)	Grécia	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	KU375577
Phlebovirus Antigone (Antigone2-Imathia-Greece-2012)	Grécia	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	KP164566
Phlebovirus Antigone (Antigone2-Pella2-Greece-2013)	Grécia	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	KU375576
Precarious point	ND*	ND*	HM566181
Punique (PI-B4-2008)	Tunísia	<i>Phlebotomus</i> sp.	JF920133
Punta Toro (Balliet)	Panamá	<i>Homo sapiens</i>	KP272022
Punta Toro (GML488831)	Panamá	<i>Homo sapiens</i>	KP272031
Punta Toro (PAN483391)	Panamá	<i>Homo sapiens</i>	KP272007
Razdan (LEIV-Arm2741)	Arménia	<i>Dermacentor marginatus</i>	NC_022630
Rift Valley	Egipto	<i>Homo sapiens</i>	NC_014397
Rift Valley (OS-1)	Mauritânia	<i>Homo sapiens</i>	DQ375398
Rift Valley (Smithburn)	Uganda	ND*	DQ375430
Rift Valley (Sudan 85-2010)	Sudão	<i>Homo sapiens</i>	JQ820485
Salehabad (I-81)	Irão	<i>Phlebotomus</i> sp.	JX472403
Salobo	ND*	ND*	HM627185
Sand fever Naples-like (Poona)	ND*	ND*	HM566176
Sandfly fever Sicilian (Ethiopia-2011)	Etiópia	<i>Homo sapiens</i>	KM042102
Sandfly Sicilian Turkey (Izmir 19)	Turquia	<i>Homo sapiens</i>	GQ847513
Serra Norte	Brasil	<i>Homo sapiens</i>	HM119428
SFTS (HNXY_319)	China	<i>Homo sapiens</i>	KC292345
SFTS (JS2011-034)	China	<i>Homo sapiens</i>	KC505132
SFTS (SPL004A)	Japão	<i>Homo sapiens</i>	AB817981
SFTS (SPL035A)	China	<i>Homo sapiens</i>	AB817986
Shibuyunji (CZCZT13-14)	Zâmbia	<i>Boophilus</i> sp.	KM370976

Anexos

Shibuyunji (CZCZT13-18)	Zâmbia	<i>Boophilus</i> sp.	KM370977
Shibuyunji (CZCZT13-22)	Zâmbia	<i>Boophilus</i> sp.	KM370978
Shibuyunji (CZCZT13-23)	Zâmbia	<i>Boophilus</i> sp.	KM370979
Silverwater (Can131)	Canada	<i>Haemaphysalis</i> <i>leporispalustris</i>	KM114257
Tacheng Tick Virus 2 (TC252)	China	<i>Dermacentor marginatus</i>	KM817684
Tehran (I-47)	Irão	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	JF939846
Toscana (AR)	França	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	EF656363
Toscana (EsPhGR40)	Espanha	<i>Phlebotomus</i> sp.	FJ153280
Toscana (H/IMTSSA)	França	<i>Homo sapiens</i>	FJ153281
Toscana (T152)	Tunísia	<i>Phlebotomus</i> sp.	JX867534
Toscana (TOSV/P51)	França	<i>Phlebotomus</i> sp.	KU204980
Uriurana	ND*	ND*	HM566189
Uukuniemi	ND*	ND*	D10759
Zaliv Terpenia (LEIV-13841Ka)	Rússia	<i>Ixodes uriae</i>	KF767463

Anexo 3 - Tabela das sequências de referência utilizadas neste estudo * ND (não disponível), ** espécie indefinida

ANEXO IV

24A_LC146434HTQ.....I.....K.....	I
70A_LC146437HTQ.....I.....K.....	
13A_LC146439HTQ.....I.....K.....	
26A_LC146440HTQ.....I.....K.....	
12A_LC146426HTQ.....I.....K.....	
50A_LC146431HTQ.....I.....K.....	
81A_LC146443HTQ.....I.....K.....	
47A_LC146428HTQ.....I.....K.....	
51A_LC146429HTQ.....I.....V.....K.....	
30A_LC146441HTQ.....I.....V.....K.....	
3A_LC146432HTQ.....I.....K.....	
23A_LC146433HTQ.....I.....K.....	
83A_LC146445HTQ.....I.....K.....	
84A_LC146446HTQ.....I.....K.....	
10A_LC146438HTQ.....I.....K.....	
8A_LC146425HTQ.....I.....K.....	
5A_LC146424HTQ.....I.....K.....	
57A_LC146436HTQ.....I.....K.....	
72A_LC146430HTQ.....I.....K.....	
82A_LC146444HTQ.....I.....K.....	
55A_LC146435HTQ.....I.....V.....K.....	
35A_LC146442HTQ.....I.....K.....	
Phlebovirus_Antigona2_KF164566HTQ.....I.....K.....	
Phlebovirus_Antigona2_KU375576T.....I.....K.....	
Phlebovirus_Antigona2_KU375577Q.....T.....I.....K.....	
Hole_Tick_Virus_1_KM817664	.R..K...TR.NPSGKI..I.....R.....I.....H.....IM...K.AE.K.T..I.D...KT...	
70A_LC146427	DERKND.HLK.....PEV.....I.....M...L...V...SQMQ...PV.EE..K...NC	
Tacheng_Tick_Virus_2_KM817684	DERKND.HL.....PEV.....I.....M...L...V...SQMQ...PV.EE..K...NC	
Changping_Tick_Virus_KM817665	R...DERKND.HLK.....PEV.....I.....M...L...V...AN...PV.EE..K...NC	II
Shibuyunji_virus_KM370979	R...CL.KS--TVDI.....QF.....I.....LI...VA.S...K.T.T..A...A.F..KL	
Shibuyunji_virus_KM370978	R...CL.KS--TVDI.....QF.....I.....LI...VA.S...K.T.T..A...A.F..KL	
Shibuyunji_virus_KM370977	R...CL.KS--TVDI.....QF.....I.....LI...VA.S...K.T.T..A...A.F..KL	
Shibuyunji_virus_KM370976	R...CL.KS--TVDI.....QF.....I.....LI...VA.S...K.T.T..A...A.F..KL	
Lihan_Tick_Virus_KM817672	A...-AIR..SQGKI.....F.....RP.....I.....R.....L...LVT.SEIE.T.RV.W...E...R.	
Huangpi_Tick_Virus_2_KM817668	RP.----MKICGNQHQ.....AR.W...GH.VS.F..L.MS...S...VF.....M...QNL.R.LET.SN.L.D...RN...SV.H.--	

Anexo 4 - Alinhamento múltiplo de seqüências da seqüência parcial da RNA polimerase de *Phlebovirus* (proteína L). As seqüências virais são indicadas pelo nome e número de acesso. As caixas limitados por linhas a tracejado definem conjuntos genéticos independentes (I, II). As combinações específicas de grupo de resíduos de aminoácidos estão indicadas a negrito. "-" Indica lacunas, introduzido para manter o alinhamento.

ANEXO V

Clones		descrição	query cover	e value	identidade
20A2 (500pb)	blastx	aminoglycoside 3'-phosphotransferase [Cloning vector pFBneo]	82%	1,00E-53	85%
		neomycin phosphotransferase [Cloning vector pBIG]	82%	2,00E-53	85%
		Aph [Allelic replacement vector pJC84]	81%	7,00E-53	84%
	blastn	PREDICTED: Cercopithecus atys uncharacterized LOC105599173 (LOC105599173), ncRNA	10%	1,5	84%
		PREDICTED: Elephantulus edwardii uncharacterized LOC102848142 (LOC102848142), misc. RNA	8%	1,5	90%
		PREDICTED: Oryza sativa Japonica Group leucine-rich repeat receptor protein kinase EMS1 (LOC102848142), mRNA	8%	5,1	91%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
20A14 (350pb)	blastx	hypothetical protein NCLIV_068840 [Neospora caninum Liverpool]	31%	1,00E-62	94%
		hypothetical protein [Plasmodium chabaudi chabaudi]	28%	2,00E-62	100%
		hypothetical protein [Plasmodium berghei strain ANKA] [Plasmodium berghei ANKA]	26%	5,00E-58	100%
	blastn	Culex quinquefasciatus hypothetical protein, mRNA	57%	0	99%
		Plasmodium chabaudi chabaudi hypothetical protein (PC403819.00.0) partial mRNA	28%	2,00E-155	100%
		Plasmodium berghei strain ANKA hypothetical protein (PB400037.00.0) partial mRNA	32%	2,00E-146	100%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
20B1 (950pb)	blastx	RecName: Full=Uncharacterized protein UL126 [Human herpesvirus 5 strain AD169]	25%	3,00E-33	98%
		hypothetical protein EC24168_1692 [Escherichia coli 2.4168]	15%	3,00E-14	95%
		hypothetical protein EC33884_2900 [Escherichia coli 3.3884]	15%	3,00E-14	95%
	blastn	Culex quinquefasciatus hypothetical protein, mRNA	14%	4,00E-48	100%
		Plasmodium chabaudi chabaudi hypothetical protein (PC403819.00.0) partial mRNA	13%	2,00E-41	100%
		Eimeria maxima hypothetical protein, conserved partial mRNA	11%	3,00E-34	100%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
20B3 (600pb)	blastx	unnamed protein product [Chondrus crispus]	51%	8,00E-24	53%
		hypothetical protein DAPPUDRAFT_67306 [Daphnia pulex]	31%	3,00E-19	77%
		Uncharacterized protein T03_13750 [Trichinella britovi]	52%	2,00E-18	49%
	blastn	PREDICTED: Oryctolagus cuniculus uncharacterized LOC103346513 (LOC103346513), mRNA	68%	5,00E-72	77%
		Mus musculus 45S pre-ribosomal RNA (Rn45s), ribosomal RNA	68%	1,00E-58	76%
		Mus musculus 28S ribosomal RNA (Rn28s1), ribosomal RNA	68%	1,00E-58	76%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
20B4 (500pb)	blastx	hypothetical protein S18_1082_0001 [uncultured Flavobacterium bacterium]	14%	4,00E-14	97%
		hypothetical protein C797_21698 [Bacillus thuringiensis Sbt003]	19%	1,00E-12	75%
		putative reverse transcriptase [Zingiber officinale]	12%	4,00E-12	100%
	blastn	Culex quinquefasciatus hypothetical protein, mRNA	26%	3,00E-104	100%
		Cryptosporidium hominis TU502 LacOPZ-alpha peptide from pUC9 (Chro.80226) partial mRNA	12%	2,00E-40	100%
		PREDICTED: Bactrocera dorsalis probable cytochrome P450 4ac1 (LOC105228765), mRNA	8%	7,00E-26	100%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
20B5 (850pb)	blastx	hypothetical protein OXYTRI_14248 [Oxytricha trifallax]	73%	1,00E-41	55%
		hypothetical protein OXYTRI_13058 [Oxytricha trifallax]	73%	1,00E-41	55%
		hypothetical protein EgrG_000335800 [Echinococcus granulosus]	73%	4,00E-36	89%
	blastn	PREDICTED: Apis florea uncharacterized LOC100865248 (LOC100865248), mRNA	93%	0,00E+00	83%
		PREDICTED: Erythrana the guttatus uncharacterized LOC105953700 (LOC105953700), mRNA	92%	9,00E-164	82%
		PREDICTED: Erythrana the guttatus uncharacterized LOC105976473 (LOC105976473), ncRNA	92%	4,00E-162	82%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
20B6 (300pb)	blastx	aminoglycoside 3'-phosphotransferase [Cloning vector pFBneo]	82%	1,00E-53	85%
		neomycin phosphotransferase [Cloning vector pBIG]	82%	2,00E-53	85%
		Aph [Allelic replacement vector pJC84]	81%	7,00E-53	84%
	blastn	PREDICTED: Cephus cinctus uncharacterized LOC107268379 (LOC107268379), mRNA	65%	4,00E-93	90%
		PREDICTED: Apis florea uncharacterized LOC105736981 (LOC105736981), mRNA	65%	2,00E-91	90%
		PREDICTED: Microplitis demolitor uncharacterized LOC106693315 (LOC106693315), ncRNA	64%	4,00E-88	90%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
20B20 (400pb)	blastx	hypothetical protein [Staphylococcus aureus]	81%	1,00E-35	66%
		hypothetical protein [Streptococcus pneumoniae]	84%	3,00E-34	55%
		Uncharacterized protein [Chlamydia trachomatis]	84%	4,00E-34	55%
	blastn	PREDICTED: Bactrocera dorsalis probable cytochrome P450 4ac1 (LOC105228765), mRNA	12%	4,00E-20	100%
		Eimeria maxima Green fluorescent protein, related partial mRNA	7%	2,00E-07	100%
		Eimeria acervulina GFP-like fluorescent chromoprotein FP506, related partial mRNA	7%	2,00E-07	100%

Clones		descrição	query cover	e value	identidade
56A5 (400pb)	blastx	hypothetical protein EmuJ_000005500 [Echinococcus multilocularis]	27%	6,00E-33	100%
		hypothetical protein CLONEX_01831 [Tyzzzeria nexilis DSM 1787]	20%	2,00E-29	100%
		UNKNOWN [Stylonychia lemnae]	26%	8,00E-28	85%
	blastn	Culex quinquefasciatus hypothetical protein, mRNA	53%	0,00E+00	100%
		PREDICTED: Tetranychus urticae uncharacterized LOC107360951 (LOC107360951), mRNA	32%	1,00E-119	96%
		PREDICTED: Hydra vulgaris uncharacterized LOC105849895 (LOC105849895), misc_RNA	32%	1,00E-114	95%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
56B1 (400pb)	blastx	Aa1-330 [Rattus norvegicus]	45%	4,00E-27	60%
		LRRG00134 [Rattus norvegicus]	45%	2,00E-26	60%
		hypothetical protein M91_21675 [Bos mutus]	46%	3,00E-25	60%
	blastn	Branchiostoma floridae hypothetical protein, mRNA	54%	2,00E-101	86%
		PREDICTED: Oryctolagus cuniculus basic proline-rich protein-like (LOC100353654), mRNA	54%	2,00E-72	81%
		PREDICTED: Rattus norvegicus collagen alpha-1(I) chain-like (LOC103693757), mRNA	57%	1,00E-69	80%
Clones		descrição	query cover	e value	identidade
56B13 (400pb)	blastx	putative tumor differentially expressed protein [Latrodectus hesperus]	34%	9,00E-27	79%
		hypothetical protein Bm1_17870 [Brugia malayi]	29%	1,00E-26	82%
		hypothetical protein LOTGIDRAFT_202939 [Lottia gigantea]	29%	9,00E-23	80%
	blastn	PREDICTED: Priapulus caudatus uncharacterized LOC106811760 (LOC106811760), transcript var	47%	9,00E-106	91%
		PREDICTED: Priapulus caudatus uncharacterized LOC106811760 (LOC106811760), transcript var	47%	9,00E-106	91%
		PREDICTED: Apis florea uncharacterized LOC100866091 (LOC100866091), ncRNA	42%	2,00E-97	92%

Anexo 5 - Resultados das 11 sequências obtidas da clonagem em vetores plasmidicos e analisadas por Blast x e Blast n.

ANEXO VI

Multiple Phlebovirus (Bunyaviridae) genetic groups detected in *Rhipicephalus*, *Hyalomma* and *Dermacentor* ticks from southern Portugal.

André Pereira^{1*}, Lúcia Figueira^{2*}, Mónica Nunes^{2,3}, Aida Esteves^{2,3}, António José Cotão⁴, Maria Luísa Vieira^{2,3}, Carla Maia^{1,3,5}, Lenea Campino^{3,5}, Ricardo Parreira^{2,3}

¹Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Campo Grande 376, 1749-024 Lisboa. ²Unidade de Microbiologia Médica, Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL) Rua da Junqueira 100, 1349-008 Lisboa, Portugal, ³Global Health and Tropical Medicine (GHTM), IHMT/UNL, ⁴Centro de Recuperação e Investigação de Animais Selvagens (RIAS)-Associação ALDEIA, Olhão, Portugal, ⁵Unidade de Parasitologia Médica, IHMT/UNL.

* A. Pereira and L. Figueira have contributed equally to this work.

Corresponding author:

Ricardo Parreira

Global Health and Tropical Medicine (GHTM), Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), Universidade Nova de Lisboa (UNL), Unidade de Microbiologia Médica (Grupo de Virologia).

Phone: +351 213652600; E-mail: ricardo@ihmt.unl.pt

Abstract

In the last decade, various research groups have reported a large diversity of new tick-borne phleboviruses, mostly prompted by the discovery of important human pathogens such as the Heartland and severe fever with thrombocytopenia syndrome viruses. Since these analyses have rarely been conducted using ticks collected from Southern Europe, this study was carried out so as to bring new insights into the diversity of phleboviruses circulating in Southern Portugal. Tick specimens were collected from the vegetation (questing ticks) or directly from animals (feeding ticks), and the majority analysed in pools using a detection strategy targeting the large (L) viral genomic segment. A high number of pools revealed the presence of phlebovirus sequences, regardless of gender (male/female), origin (questing/feeding) or even species of the tick analysed. These sequences apparently formed three different groups in phylogenetic trees, and encoded L proteins characterized by group-specific amino acid residues. Furthermore, under the conditions used, these viruses failed to replicate in both Vero and DH82 cells. The impact these viruses may have on human/animal health will be addressed in the future.

Keywords: Phleboviruses, Southern Portugal, ticks, phylogenetic characterization, L-segment sequences.

Introduction

The Bunyaviridae family of viruses comprises a profusion of genetically diverse enveloped viral agents, with segmented, single-stranded genomes with negative polarity, and exclusively cytoplasmic replication (Guo et al., 2012). They are able to infect a wide range of hosts, and more than 350 bunyaviruses have already been identified. Over time, their genetic, biochemical, morphological as well as serological features have led to their classification into the genera Tospovirus (including bunyaviruses that infect plants), Orthobunyavirus, Hantavirus, Nairovirus, and Phlebovirus (Elliot and Schmaljohn, 2013).

Phleboviruses encompass 9 viral species (ICTV, 2016) that unlike most other bunyaviruses use an ambisense coding strategy in the S segment (encoding the N and Ns proteins). Many of these viruses are emerging pathogens, and they are frequently, though not always, transmitted to vertebrates by phlebotomine sand flies (e.g. Toscana and Naples viruses) and mosquitoes (eg. Rift Valley fever and Gouleako viruses) (Elliott and Brennan, 2014). However, in recent years, a wide range of very diverse tick-borne phleboviruses (TBPV) have also been described and/or genetically characterized, frequently as a direct result of a more generalized use of metagenomic approaches combined with a more facilitated access to next generation sequencing (NGS) technologies. These TBPV include, for instance, those forming the so-called Bhanja, Kaisodi and Uukuniemi genetic lineages (Dilcher et al., 2012; Elliot and Brennan, 2014; Matsuno et al., 2015), the highly pathogenic severe fever with thrombocytopenia syndrome (SFTSV; Yu et al., 2011) and Heartland viruses (Savage et

al., 2013), and a myriad of divergent phlebovirus sequences detected in multiple species of hard and soft bodied-ticks (Tokarz et al., 2014; Li et al., 2015; Xia et al., 2015).

In Portugal, occasional reports of central nervous system infections caused by the Toscana virus (Santos et al., 2007), along with the recent isolation of the Arrabida and Arbia-like viruses in the south of the country (Amaro et al., 2015; 2016), indicate the circulation of different genetic lineages of phleboviruses transmitted by phlebotomine sand flies. However, over two decades ago, the tick-borne Palma virus was also isolated from *Haemaphysalis punctata* ticks feeding on healthy cattle from a Portuguese farm (Filipe et al., 1994). Nonetheless, the number of studies exploring the diversity of TBPV from Portugal is scarce, in line with an overall lack of information on this group of viruses from other Southern European countries. Very recently, a new distinct clade of divergent TBPV was identified in Greece (Papa et al., 2016) in ticks belonging to the *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato group (Dantas Torres et al., 2013). In the present study we describe the detection of putative phleboviruses in different species of hard-bodied ticks from three genera, via RT-PCR amplification of partial L-segment sequences. We also use phylogenetic, genetic-distance, and amino acid sequence analyses for viral nucleic acid sequence characterization.

Materials and methods

Study area and tick collection

Portugal, the westernmost country in continental Europe, displays a set of climatic features influenced by the Atlantic Ocean and the Mediterranean Sea (Information available at <http://www.florestar.net>. Access in 20-11-2015). Its continental territory covers approximately 92,090 km² of land surface, where the southern part of the country is mainly characterized by agroforestry and forest grazing areas.

A total of 576 ticks were collected between the months of December 2013 and September 2015 directly from domestic [cow (*Bos taurus*), sheep (*Ovis aries*), and dog (*Canis familiaris*)] and sylvatic animals [hedgehog (*Erinaceus europaeus*), hare (*Lepus europaeus*), rabbit (*Oryctolagus cuniculus*), wild boar (*Sus scrofa*), fox (*Vulpes vulpes*), European badger (*Meles meles*), beech marten (*Martes foina*)], and a number of resident and migratory birds, including *Otis tarda*, *Accipiter gentilis*, *Buteo buteo*, *Bubo bubo*, *Aquila fasciata*, *Accipiter gentilis*, *Tyto alba*, *Larus fuscus*, *Larus michahellis*, *Corvus corone*, *Athene noctua*, *Alectoris rufa*, and *Phoenicurus phoenicurus*. Tick collections were carried out at 18 sites (black markings in Fig. 1) in Southern Portugal, in the districts of Lisboa, Setúbal, Beja and Faro (regions 1 to 4, respectively, in Fig.1). All the animals were alive at the time ticks were collected from them, and tick removal was carried out in compliance with the Portuguese legislation for the protection of animals (Decree-Law no. 113/2013).

Additionally, between May and July of 2014, a total of 461 questing ticks were collected by flagging with a 1x1m cloth over low and high vegetation at five sites in Southern Portugal (grey marks in Fig. 1). One of the collection sites corresponded to EVOA (The Tagus Estuary Birdwatching and Conservation Area), located in the Tagus river estuary in the district of Lisboa, near the city of Vila Franca de Xira. The other four sites where ticks were collected from the vegetation were located in the district of Setúbal. For logistic convenience, these collection sites were located close to the villages of Grândola and Alcácer do Sal (which are separated by 23km).

All the tick specimens were kept alive at 4 °C until they were identified at the species level using taxonomic keys (Estrada-Peña et al., 2004; Pérez-Eid, 2006), and then stored in vials at -80 °C until further use. Alternatively, in those situations when immediate transport to the laboratory could not be guaranteed, the collected specimens were kept up to one week at -20 °C in *RNAlater*[®] (Ambion, EUA).

Preparation of tick homogenates and RNA extraction

The preparation of tick homogenates (usually in pools of up to 16 specimens where ticks were grouped according to species, developmental stage, sex, and geographic origin) was carried out by mechanical disruption. The ticks were placed in 1.5 ml Eppendorf test tubes and crushed using a sterile pestle in 1ml of either TRIzol[®] (Invitrogene, EUA) or 4% bovine serum albumin (fraction V; NZYTech, Portugal) in phosphate buffered saline (PBS) . In the latter case an aliquot of approximately 200 µl was immediately placed at -80 °C to allow for virus isolation. RNA was extracted from

the homogenates using TRIzol[®] as indicated by the supplier dissolved in nuclease-free water and half of these homogenates were immediately treated with NZY DNase I[®] (NZYTech, Portugal). The RNA was quantified in a Nanodrop 1000 (Thermo Scientific, EUA), and either stored at -80 °C (until further use), or immediately used as template for reverse transcription carried out using the NZY First-Strand cDNA Synthesis Kit (NZYTech, Portugal). Between 500-1000 ng of RNA (depending on the RNA concentration in each extract) were used to start reverse transcription which was carried out using random hexamers. Detection of phleboviruses (L-segment) was performed by PCR using NZYTaq 2X Green Master Mix (NZYTech, Portugal), and a mixture of the ppL1/ppL2 primers (40 pmol each) with the reaction conditions previously described by Matsuno et al. (2015). These included 40 cycles of amplification with 1 cycle consisting of a denaturation step at 94°C for 30 s, a hybridization plateau at 55°C for 30 s, and an extension step at 72°C for 1 min/1 kb (followed by a final extension 72°C for 5 min). The obtained amplicons (approximately 500 bp) were purified and directly sequenced.

Cell culture and virus isolation

Viral isolation from tick homogenate was attempted using both Vero E6 (ATCC CRL-1586) and DH82 cell lines (Wellman et al., 1988) that were kept at 37 °C with 5% CO₂ in Dulbecco's Modified Eagle Medium (Lonza, Walkersville/MD, USA) supplemented with 10% FBS. Approximately 200 µl of tick homogenate was filter-sterilized (0.22µm Acrodisc[®] syringe filters, Pall Corporation, USA), diluted in the same volume of PBS,

and then inoculated onto subconfluent layers of either Vero E6 or DH82 cells grown in T25 culture flasks (Nunc, Roskilde, Denmark). After 1 h of adsorption, the inoculum was removed, 5 ml of fresh medium (5% FBS) was added to each flask, and the cell cultures were incubated at 37 °C for a week. All the culture supernatants collected up to the second blind passage (totaling three successive viral passages) were stored at –80 °C until used for phlebovirus detection. Cytopathic effect (CPE) was assessed by microscopic observation of the inoculated cell cultures.

DNA sequencing and genetic analyses

Nucleotide (nt) sequence similarity searches were carried out through the NCBI web server using BLASTn (Megablast and discontinuous Megablast options; <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Multiple alignments of nt and amino acid (aa) sequences were performed using the iterative G-INS-I method as implemented in MAFFT vs. 7 (Katoh and Standley, 2013). Editing of the alignments was done using the GUIDANCE guide-tree based alignment confidence score (Penn et al., 2010), selecting columns with confidence levels above 0.9. Average intra- and inter-group genetic distances (calculated as the number of base substitutions per site from averaging over all sequence pairs within/between each group) were corrected using Kimura's 2-parameter formula, as implemented in the Mega 6.0 software (Tamura et al., 2013).

Phylogenetic trees were constructed using Maximum Likelihood (ML) and Bayesian approaches, using the best fitting evolutionary model (GTR+ Γ +I; GTR-General Time Reversal, Γ -Gamma distribution, I-proportion of invariant sites), on the basis of the AIC

selection criterion, as suggested by JModeltest2 (Darriba et al., 2012). Phylogenetic reconstructions based on the ML optimization criterion were carried out using Mega 6.0, and the stability of the obtained tree topologies assessed by bootstrapping with 1000 re-samplings of the original sequence data. Additionally, phylogenetic reconstruction was also carried out following a Bayesian approach were conducted using MrBayes v3.0b4 (Ronquist and Huelsenbeck, 2003). These analyses consisted of 5×10^7 generations starting from a random tree and four Markov chains with default heating values, sampled every 100th generation. Two separate runs were conducted for each analysis, and the first 10% sampled trees discarded as burn-in, before obtaining a consensus tree. Finally, Maximum Clade Credibility trees were constructed using BEASTv1.7.5 (Drummond et al., 2012), using the GTR+ Γ +I model, and as coalescent priors a Bayesian skyline plot (for estimating demographic population growth), under both strict and uncorrelated exponentially relaxed molecular clocks. These analyses were run for 1×10^8 generations starting from a random tree with sampling at every 5000th generation. The results of two separate runs were combined using LogCombiner (available at <http://beast.bio.ed.ac.uk/logcombiner>), and the first 10% discarded as burn-in. For each case, convergence was monitored with Tracer v1.6 (available from <http://beast.bio.ed.ac.uk/Tracer>), ensuring that all ESS values were above 200. The obtained phylogenetic trees were manipulated for display using FigTree v.1.4.2. (available at <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>). The nucleotide (nt) sequences obtained in the course of this study were deposited in the GenBank/EMBL/DDBJ databases under accession numbers LC146409-LC146446 (table 1). All the samples

analysed in the course of this work have been listed in supplementary table 1. The reference sequences used in the analyses presented here, directly downloaded from the public sequence databases, are listed in supplementary table 2.

Results

This work was carried out in order to investigate the presence of phleboviruses in ticks collected in four districts from Southern Portugal (Fig. 1). Altogether, a total of 1037 ticks were collected (Table 1 and Supplementary table 1), and these included both questing specimens (n=461; including *Dermacentor marginatus*, *Hyalomma marginatum*, *Rhipicephalus sanguineus* s.l., and *R. bursa*) as well as those feeding on a multitude of mammals and birds (n=576; including *Dermacentor marginatus*, *Haemaphysalis punctata*, *Hyalomma marginatum*, *H. lusitanicum*, *Ixodes acuminatus*, *I. ricinus*, *I. frontalis*, *Rhipicephalus bursa*, *R. pusillus*, and *R. sanguineus* s.l.). The great majority of these ticks were analysed in pools of up to 10 individuals, but 64 male specimens were screened as 4 pools of 16 individuals. Finally, 13 pools of 4 specimens were also de-pooled, allowing the assessment of the presence of phleboviruses in individual specimens (see below). The strategy used a one-step RT-PCR protocol and degenerate primers targeting the L genomic segment of phleboviruses, recently described by Matsuno et al. (2015).

From a total of 149 pools of ticks collected while feeding on vertebrate animals, positive amplification results were detected in 38 of them (25.5 % detection rate). Thirteen of these pools were de-fragmented, and in the majority of them (n=10), phlebovirus sequences were detected in either one or two tick specimens, with only three pools revealing three virus-infected ticks. Although this sample represents only a small fraction (less than 10 %) of the ticks that were analysed, the obtained results do suggest that the presence of phleboviruses in these invertebrates is common. High

detection rates were similarly obtained when the analysis focused on questing ticks. From a total of 50 pools, the RT-PCR strategy used revealed the presence of phlebovirus genomes in 41 of them (82.0 % detection rate), in both female and male specimens. The great majority of the amplification results were associated with *Rhipicephalus bursa* and *R. sanguineus* s.l. ticks, but this apparent high infection rate may be affected by sampling bias, as these two species comprised the great majority (88.1 %) of the questing ticks that were collected. Finally, the detection rate values indicated should not be interpreted as prevalence of phleboviruses in the analysed ticks. It is possible that other amplification protocols using alternative combinations of more sensitive primers (especially if based on qRT-PCR) might reveal additional viral strains among those ticks for which no virus amplification result was obtained.

The ability to detect these sequences also seemed independent of treatment of the prepared RNA extracts with DNase I (data not shown). Furthermore, PCR amplification results were reproducibly negative in case the reverse transcription step was omitted, suggesting the obtained amplicons had not been amplified from genomic DNA (data not shown).

Although a total of 122 immature tick forms were tested, the presence of phleboviruses were only revealed in adult specimens. Despite the fact that these immature forms represented almost all the species analysed (with the exception of *D. marginatus* and *R. bursa*), their numbers reflected a clear sampling bias, as 75.8 % (n=97) of them were classified as *Hyalomma* (n=75, 58.6 %) or *Ixodes* (n=22, 11.2 %). On the other hand,

phlebovirus sequences were not detected in RNA extracts prepared from *Ixodes* ticks analysed, and only one *H. marginatum* specimen was found to harbor TBPV.

A total of 38 L segment-specific amplicons were sequenced (listed in table 1) and their initial analysis was carried out with MegaBlast or discontinuous MegaBlast. The results obtained revealed nucleotide sequence identities ranging from 81 % to 85 % (95 % query cover; $E < e^{-108}$) with homologous sequences found in the provisionally designated Antigone phlebovirus genome, recently detected in *R. sanguineus* s.l. ticks from Greece (strains Pella and Imathia; Papa et al., 2016).

For further characterization of these sequences, phylogenetic analyses were carried out, and these involved the construction of both consensus (using ML and Bayesian approaches) and MCC trees, using two datasets. An initial analysis, including a large collection (n=103) of viral reference sequences representing the majority of the known phlebovirus strains (supplementary Fig. 1A and 1B), clearly placed the phlebovirus sequences reported here in a single monophyletic group supported by both high bootstrap and posterior probability values. This group not only included the Antigone virus sequences, but also those of a collection of putative viruses recently identified in metagenomic-based studies carried out in China (Li et al., 2015) and the USA (Tokarz et al., 2014). To gain a better resolution of the phylogenetic connections linking the viral sequences described here to those of previously-described phleboviruses, a smaller dataset was used, which included a selection of 42 reference sequences, representing only the major phlebovirus genetic groups (Fig. 2A and 2B). As expected, all the sequences described here shared common ancestry but segregated in three independent

groups. One of them included a sequence (tentatively designated RiPar tick virus 1; accession number LC146427) amplified from a pool of questing *D. marginatus* ticks collected close to the village of Grândola (in the district of Setúbal), which segregated with Changping tick virus 1 and Tacheng tick virus 2 (Li et al., 2015). An independent viral group (KarMa) was apparently formed by three viral sequences detected in *R. sanguineus* s.l., *R. bursa*, and *H. marginatum* (accession numbers LC146409, LC146411, and LC146423), displaying low average sequence diversity (0.031). Finally, a third viral group, with a calculated average low genetic diversity of 0.076, included the largest collection of viral sequences described here (AnLuc group), were amplified from *R. sanguineus* s.l. and *R. bursa*. The unique nature of these groups was further suggested when inter-group genetic distances were calculated. These were shown to be at least three times higher than the calculated intra-group distances (over 0.26). Moreover, each of these groups of sequences was also characterized by the presence of unique group-specific combinations of certain amino acid residues in the putative L protein they supposedly encode (supplementary Fig. 2).

In order to proceed with further analysis of the putative viruses in question, an attempt was made to isolate them in Vero E6 and DH82 cells. These cells were inoculated with filter-sterilized aliquots of a randomly-selected collection (n=19) of homogenates (including both questing ticks and those directly removed from hosts), and then followed for three weeks with weekly blind passages. Although evident CPE was observed 24-48h after the first inoculation in both cell lines, this CPE was no longer visible at successive blind passages (data not shown). The CPE initially observed was

most probably due to physiological changes resulting from the contact of Vero and DH82 cells with the tick-homogenate. Furthermore, while L-segment sequences were still amplified from the inoculum collected following the adsorption period, no amplicons were obtained after the 1st or 2nd passages, depending on the homogenate used (Fig. 3). These results demonstrated that the putative phlebovirus here detected could not readily infect either Vero (monkey kidney epithelial) or DH82 (canine macrophage) cells.

Discussion

Although NGS has undoubtedly revolutionized the field of viral discovery and genetic characterization, its high performance relies on virion enrichment in the samples to be analysed. This virus-enrichment step can be accomplished by virus isolation in cell culture and/or viral particle purification using density-dependent ultracentrifugation (Breitbart and Rohwer, 2005; Thurber et al., 2009; Firth and Lipkin, 2013). Even when these enrichment/purification steps fail, or cannot be performed, contaminant non-viral (non-encapsidated) nucleic acids may still be eliminated using a combination of filtration and nuclease digestion, prior to massive parallel sequencing.

However, when viral screening relying on NGS may not be carried out for technical/financial reasons, genomic characterization of new viruses may still be conducted based on either sequence-independent (e.g. SISPA, VIDISCA) or sequence-directed amplification protocols (Ambrose and Clewly, 2006). Despite the potential limited sensitivity and/or specificity of the latter, detection of viral genomes based on conventional PCR (or RT-PCR) is still used on a regular basis in most laboratory settings. As an example, the identification, and partial genetic characterization, of a broad range of phleboviruses has been recently rekindled with studies such as that carried out by Matsuno et al. (2015). These authors described a simple phlebovirus detection approach, based on the use of genus-specific primers targeting the genomic L-segment in combination with a one-step amplification protocol. Due to its simplicity and apparent efficiency, this strategy was used here to screen a collection of over 1000 ticks for the presence of phleboviruses. Moreover, and since the DNA fragments

obtained were slightly over 500 nt in length, amplification of viral sequences also set the stage for genetic analyses based on DNA sequencing.

The results reported in this study indicated that a large number of the adult tick pools analysed were found to harbor phleboviruses. These were detected both in questing ticks and in those collected directly from animals. As an example of the fact that these putative viruses were found in ticks regardless of their sex or species, one of the viral genetic groups identified (tentatively designated KarMa), included sequences amplified from three species of ticks from two different genera (*H. marginatum*, *R. bursa*, *R. sanguineus* s.l.).

Although the pathogenic nature of the viruses that were identified in the course of this work remains to be established, their frequent detection in the analysed pools, in association with their apparent inability to replicate in Vero and DH82 cells, is compatible with the suggestion that they may correspond to tick-specific viruses. Nevertheless, and as previously described by Hardestam et al. (2007), bunyaviruses display great variation in their stability under wet conditions. In particular, the sand fly fever Sicilian phlebovirus (SFSV) showed considerable stability at all temperatures tested (from 4°C to 37°C), probably reflecting adaptation to an exothermic host. Although Hardestam et al. only evaluated viral stability ex vivo, it becomes possible to speculate that at least some of the phleboviruses detected in the course of our study may have been acquired by immature ticks while feeding on a vertebrate host. These viruses could have survived the molt(s), and still be detected in adult ticks by molecular means.

In contrast to the large variety of viruses frequently detected in mosquitoes that can only replicate in insect cells (Junglen and Drosten, 2013), putative tick-specific viruses have not yet been thoroughly studied. Only one example has actually been described (St Croix River virus, Attoui et al., 2001), but it is likely that others may exist (Nuttall, 2009). On the other hand, the putative viruses present in field material, irrespective of their pathogenic nature, may simply be unable to readily infect laboratory maintained mammalian cell lines (as previously described). Should this be the case, their isolation will require the use of tick cell lines, that are often readily susceptible to infection by TBPV (Bell-Sakyi et al., 2012). Despite the fact that 12.3 % of the analysed invertebrates corresponded to immature forms (both larvae and nymphs), TBPV were only successfully detected in adult ticks. However, this observation may simply reflect the bias in the genera of immature specimens analysed that included those in which TBPV were not detected (*Ixodes*) or were detected in just a single individual (*Hyalomma*). Therefore, and for the time being, the putative tick-restricted or potential pathogenic nature of these viruses, whether they are ecologically maintained by transovarial/transtranstadial transmission, and/or acquired from a small vertebrate animal reservoir before the ticks reach the adult stage are all moot issues, that should be addressed in future studies.

Both phylogenetic and genetic-distance analyses indicated that the viral sequences described here segregate into three viral groups. Nevertheless, they share a common ancestry, grouping into a large monophyletic group with previously identified viruses, including the Antigone phleboviruses recently identified in Greece (Papa et al., 2016).

Not only were these genetic groups consistently identified in all the phylogenetic trees that were constructed, but each one was also associated with putative L-protein sequences characterized by specific groups of amino acid residues. Therefore, and despite the fact that this study focused exclusively on the partial analysis of a single genetic marker, the data obtained support the genetic uniqueness of the detected viral groups. Furthermore, and since one of these viruses (RiPar tick virus 1) was exclusively revealed in a single pool of *D. marginatus* ticks, given the overall dominance of *Rhipicephalus* ticks among those analysed, it is possible other phleboviruses may likely remain undetected, especially in non-*Rhipicephalus* ticks.

Many genetically diverse phleboviruses have been described in recent times, especially in association with the highly abundant, genetically diverse phylum Arthropoda, which includes ticks (Bichaud et al., 2014; Wang et al., 2014; Li et al., 2015; Matsuno et al., 2015). Furthermore, due to the segmented nature of their genomes, the presence of genetically distinct bunyaviruses in the same host brings to the fore the possibility for genetic reassortment to occur, and this can induce dramatic, and unexpected, phenotypic changes caused by new combinations of viral genomic segments (Gerrard et al., 2004). Although genetic reassortment has not been extensively described in association with tick-borne viruses (Briese et al., 2013), the detection of different viral groups in close geographic association and in multiple hosts, provides the opportunity for these genetic exchanges to occur. These facts justify the need to better characterize this group of viruses, as a potential source of new infectious agents with pathogenic potential for humans and for other animals.

Acknowledgements

We are deeply thankful to the administrators of Herdade da Ribeira Abaixo, EVOA (Espaço de Visitação e Observação de Aves), Federação de Caçadores do Algarve, Clube de Caçadores e Pescadores de Tavira, and to Centro de Recuperação e Investigação de Animais Selvagens (RIAS) for allowing and/or for actively collaborating in the collection of ticks. This study was support by the Portuguese Ministry of Education and Science (via Fundação para a Ciência e a Tecnologia), through a PhD grant SFRH/BD/78325/2011.

References

- Amaro, F., Hanke, D., Zé-Zé, L., Alves, M.J., Becker, S.C., Höper, D., 2016. Genetic characterization of Arrabida virus, a novel phlebovirus isolated in South Portugal. *Virus Res.* 214, 19-25.
- Amaro, F., Zé-Zé, L., Alves, M.J., Börstler, J., Clos, J., Lorenzen, S., Becker, S.C., Schmidt-Chanasit, J., Cadar, D., 2015. Co-circulation of a novel phlebovirus and Massilia virus in sandflies, Portugal. *Virol. J.* 12, 174.
- Ambrose, H.E., Clewley, J.P., 2006. Virus discovery by sequence-independent genome amplification. *Rev. Med. Virol.* 16, 365-383.
- Attoui, H., Stirling, J.M., Munderloh, U.G., Billoir, F., Brookes, S.M., Burroughs, J.N., de Micco, P., Mertens, P.P., de Lamballerie, X., 2001. Complete sequence characterization of the genome of the St Croix River virus, a new orbivirus isolated from cells of *Ixodes scapularis*. *J. Gen. Virol.* 82, 795-804.
- Bell-Sakyi, L., Kohl, A., Bente, D.A., Fazakerley, J.K., 2012. Tick cell lines for study of Crimean-Congo hemorrhagic fever virus and other arboviruses. *Vector Borne Zoonotic Dis.* 12, 769-781.
- Bichaud, L., de Lamballerie, X., Alkan, C., Izri, A., Gould, E.A., Charrel, R.N., 2014. Arthropods as a source of new RNA viruses. *Microb. Pathog.* 77, 136-141.

Breitbart, M., Rohwer, F., 2005. Method for discovering novel DNA viruses in blood using viral particle selection and shotgun sequencing. *Biotechniques* 39, 729-736.

Briese, T., Calisher, C.H., Higgs, S., 2013. Viruses of the family *Bunyaviridae*: are all available isolates reassortants? *Virology* 446, 207-216.

Dantas-Torres, F., Latrofa, M.S., Annoscia, G., Giannelli, A., Parisi, A., Otranto, D., 2013. Morphological and genetic diversity of *Rhipicephalus sanguineus* sensu lato from the New and Old Worlds. *Parasit. Vectors* 6, 213.

Darriba, D., Taboada, G.L., Doallo, R., Posada, D., 2012. jModelTest 2: more models, new heuristics and parallel computing. *Nat. Methods*. 9, 772.

Dilcher, M., Alves, M.J., Finkeisen, D., Hufert, F., Weidmann, M., 2012. Genetic characterization of Bhanja virus and Palma virus, two tick-borne phleboviruses. *Virus Genes*. 45, 311-315.

Drummond, A.J., Suchard, M.A., Xie, D., Rambaut, A., 2012. Bayesian phylogenetics with BEAUti and the BEAST 1.7. *Mol. Biol. Evol.* 29, 1969-1973.

Elliot, R.M., Schmaljohn, C.S., 2013. *Bunyaviridae*, in: Knipe, D.M., Howley, P.M. (Eds), *Fields Virology*, Wolters Kluwer/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp. 1244-1282.

Elliott, R.M., Brennan, B., 2014. Emerging phleboviruses. *Curr Opin Virol.* 5, 50-57.

Estrada-Peña, A., Bouattour, A., Camicas, J.L., Walker, A.R., 2004. Ticks of Domestic Animals in the Mediterranean Region: A Guide to Identification of Species. Universidade de Zaragoza, Zaragoza.

Filipe, A.R., Alves, M.J., Karabatsos, N., de Matos, A.P., Nuncio, M.S., Bacellar, F., 1994. Palma virus, a new *Bunyaviridae* isolated from ticks in Portugal. Intervirology 37, 348–351.

Firth, C., Lipkin, W.I., 2013. The genomics of emerging pathogens. Annu. Rev. Genomics Hum. Genet. 14, 281-300.

Gerrard, S.R., Li, L., Barrett, A.D., Nichol, S.T., 2004. Ngari virus is a Bunyamwera virus reassortant that can be associated with large outbreaks of hemorrhagic fever in Africa. J. Virol. 78, 8922-8926.

Guu, T.S., Zheng, W., Tao, Y.J., 2012. Bunyavirus: structure and replication. Adv. Exp. Med. Biol. 726, 245-266.

Hardestam, J., Simon, M., Hedlund, K.O., Vaheri, A., Klingström, J., Lundkvist, A., 2007. Ex vivo stability of the rodent-borne Hantaan virus in comparison to that of arthropod-borne members of the *Bunyaviridae* family. Appl. Environ. Microbiol. 73, 2547-2551.

ICTV, 2016. <http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp> (accessed 09.04.16).

Junglen, S., Drosten, C., 2013. Virus discovery and recent insights into virus diversity in arthropods. Curr. Opin. Microbiol. 16, 507–513.

Katoh, K., Standley, D.M., 2013. MAFFT multiple sequence alignment software version 7: improvements in performance and usability. *Mol. Biol. Evol.* 30, 772 - 780.

Li, C.X., Shi, M., Tian, J.H., Lin, X.D., Kang, Y.J., Chen, L.J., Qin, X.C., Xu, J., Holmes, E.C., Zhang, Y.Z., 2015. Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife* 29, 4.

Matsuno, K., Weisend, C., Kajihara, M., Matysiak, C., Williamson, B.N., Simuunza, M., Mweene, A.S., Takada, A., Tesh, R.B., Ebihara, H., 2015. Comprehensive molecular detection of tick-borne phleboviruses leads to the retrospective identification of taxonomically unassigned bunyaviruses and the discovery of a novel member of the genus phlebovirus. *J Virol.* 89, 594-604.

Nuttall, P.A., 2009. Molecular characterization of tick-virus interactions. *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 14, 2466-2483.

Papa, A., Kontana, A., Tsioka, K., Chaligiannis, I., Sotiraki, S., 2016. Novel phleboviruses detected in ticks, Greece. *Ticks Tick Borne Dis.* 7, 690-693.

Penn, O., Privman, E., Landan, G., Graur, D., Pupko, T., 2010. An alignment confidence score capturing robustness to guide tree uncertainty. *Mol. Biol. Evol.* 27, 1759-1767.

Pérez-Eid, C., 2006. Les Tiques: Identification, Biologie, Importance Médicale Et Veterinaire. Paris, France: Lavoisier.

Ronquist, F., Huelsenbeck, J.P., 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics*. 12, 1572-1574.

Santos, L., Simões, J., Costa, R., Martins, S., Lecour, H., 2007. Toscana virus meningitis in Portugal, 2002-2005. *Euro Surveill*. 12, E3-4.

Savage, H.M., Godsey, M.S. Jr., Lambert, A., Panella, N.A., Burkhalter, K.L., Harmon, J.R., Lash, R.R., Ashley, D.C., Nicholson, W.L., 2013. First detection of heartland virus (*Bunyaviridae: Phlebovirus*) from field collected arthropods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 89, 445-452.

Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A., Kumar, S., 2013. MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30, 2725–2729.

Thurber, R.V., Haynes, M., Breitbart, M., Wegley, L., Rohwer, F., 2009. Laboratory procedures to generate viral metagenomes. *Nat. Protoc.* 4, 470-483.

Tokarz, R., Williams, S.H., Sameroff, S., Sanchez Leon, M., Jain, K., Lipkin, W.I., 2014. Virome analysis of *Amblyomma americanum*, *Dermacentor variabilis*, and *Ixodes scapularis* ticks reveals novel highly divergent vertebrate and invertebrate viruses. *J. Virol.* 88, 11480-11492.

Wang, J., Selleck, P., Yu, M., Ha, W., Rootes, C., Gales, R., Wise, T., Crameri, S., Chen, H., Broz, I., Hyatt, A., Woods, R., Meehan, B., McCullough, S., Wang, L.F.,

2014. Novel phlebovirus with zoonotic potential isolated from ticks, Australia. *Emerg. Infect. Dis.* 20, 1040-1043.

Wellman, M.L., Krakowka, S., Jacobs, R.M., 1988. A macrophage-monocyte cell line from a dog with malignant histiocytosis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 24, 223-229.

Xia, H., Hu, C., Zhang, D., Tang, S., Zhang, Z., Kou, Z., Fan, Z., Bente, D., Zeng, C., Li, T., 2015. Metagenomic profile of the viral communities in *Rhipicephalus* spp. ticks from Yunnan, China. *PLoS One* 10, e0121609.

Yu XJ1, Liang MF, Zhang SY, Liu, Y., Li, J.D., Sun, Y.L., Zhang, L., Zhang, Q.F., Popov, V.L., Li, C., Qu, J., Li, Q., Zhang, Y.P., Hai, R., Wu, W., Wang, Q., Zhan, F.X., Wang, X.J., Kan, B., Wang, S.W., Wan, K.L., Jing, H.Q., Lu, J.X., Yin, W.W., Zhou, H., Guan, X.H., Liu, J.F., Bi, Z.Q., Liu, G.H., Ren, J., Wang, H., Zhao, Z., Song, J.D., He, J.R., Wan, T., Zhang, J.S., Fu, X.P., Sun, L.N., Dong, X.P., Feng, Z.J., Yang, W.Z., Hong, T., Zhang, Y., Walker, D.H., Wang, Y., Li, D.X., 2011. Fever with thrombocytopenia associated with a novel bunyavirus in China. *N. Engl. J. Med.* 364, 1523-1532.

Figure legends

Figure 1 – Distribution of the tick collection sites as a function of Portugal's administrative (district) organization. The districts of Lisboa (1), Setúbal (2), Beja (3) and Faro (4) are highlighted. Black marks represent locations where specimens were directly collected from animals, while those in grey represent locations where collections of questing ticks were made.

Figure 2A - Phylogenetic analysis (unrooted consensus tree) of phlebovirus L-segment nucleotide sequences. At specific branch nodes bootstrap values (b) $\geq 75\%$ or posterior probabilities (pp) ≥ 0.90 are indicated. Bootstrap/posterior probability values below these limits are indicated by “–”. The size bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. Viral sequences are identified by their name and accession number (underscore). **2B** - Maximum Clade Probability Trees based on the analysis of phlebovirus L-sequences. At specific branch nodes posterior probabilities (pp) ≥ 0.80 are indicated. The pair of pp values (pp1/pp2) indicate those obtained on the bases of assuming, as coalescent priors, a strict (pp1) or uncorrelated exponentially relaxed clock (pp2). Posterior probability values below these limits are not indicated. The tree was rooted using as an outgroup the Gouleako virus L sequence (HQ541738). The sequences obtained in this study are indicated in bold-face.

Figure 3 – Detection of a ≈ 500 bp fragment of the phlebovirus L segment in tick homogenates and Vero cell culture supernatants as a function of time. MWM indicates NZYDNA Ladder VI (NZYTech, Portugal), while Inoc.1-3 indicate each of the successive weekly blind passages (initial inoculation and two blind-passages). Mac. signals the analysis of the homogenate used for inoculation of Vero cells collected after 1 h of contact with the cell monolayer (adsorption). Mock indicates the supernatant collected from non-infected cells, and PCR(-) the negative amplification control (no DNA used). Detection of phlebovirus genomes is revealed by the observation of an amplicon migrating slightly above the MWM 500 bp band.

Supplementary figure 1A - Phylogenetic analysis (unrooted consensus tree) of phlebovirus L segment nucleotide sequences (large dataset). At specific branch nodes bootstrap values (b) $\geq 75\%$ or posterior probabilities (pp) ≥ 0.90 are indicated. Bootstrap/posterior probability values below these limits are indicated by “–”. The size bar indicates the number of nucleotide substitutions per site. Viral sequences are identified by their name and accession number (underscore). The dotted line box indicates a monophyletic group including all the sequences detected in the course of this work. **1B** - Maximum Clade Probability Trees based on the analysis of phlebovirus L segment sequences. At specific branch nodes posterior probabilities (pp) > 0.80 are indicated. The pair of pp values (pp1/pp2) indicate those obtained on the basis of assuming, as coalescent priors, a strict (pp1) or uncorrelated exponentially relaxed clock

(pp2). Posterior probability values below these limits are not indicated. The tree was rooted at midpoint. The sequences obtained in this study are indicated in bold-face.

Supplementary figure 2 – Multiple sequence alignment of the partial sequence of phlebovirus RNA polymerase (L protein). Viral sequences are indicated by name and accession number (underscore). The boxes limited by dotted lines define independent genetic groups (I, II and III). In the latter, group-specific combinations of amino acid residues are indicated in bold-face. “–” indicate gaps, introduced to maintain the alignment.

Figure 1vs2, Pereira et al., 2016

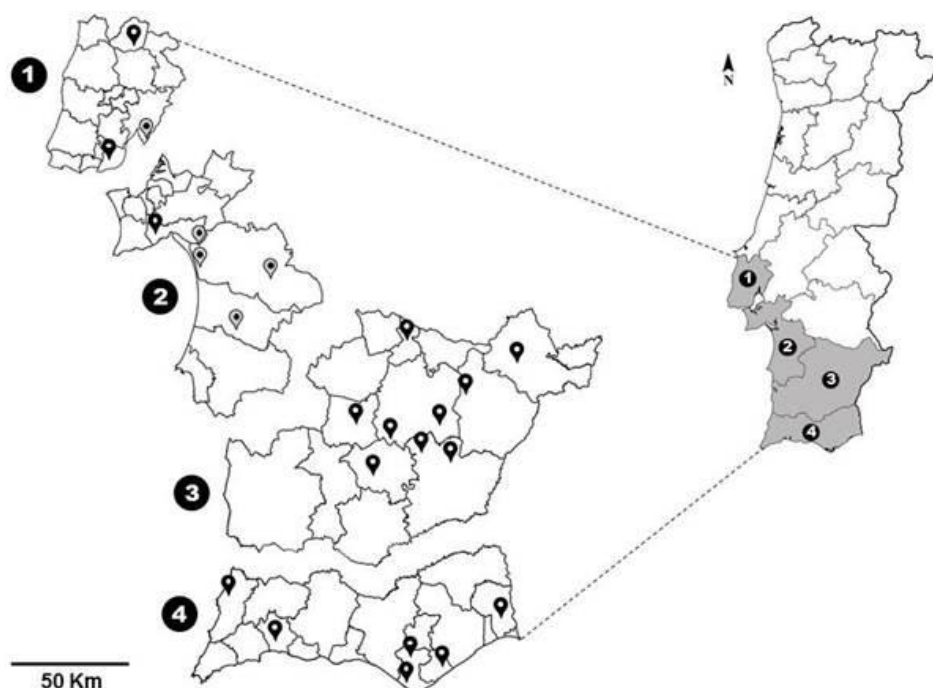
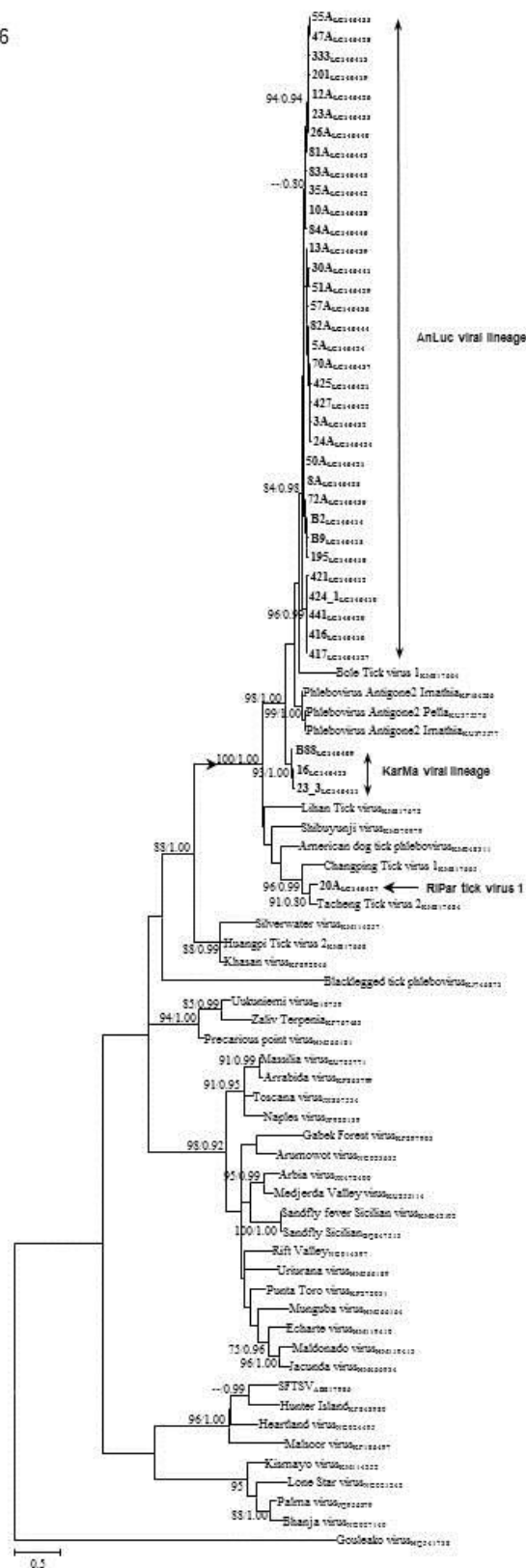
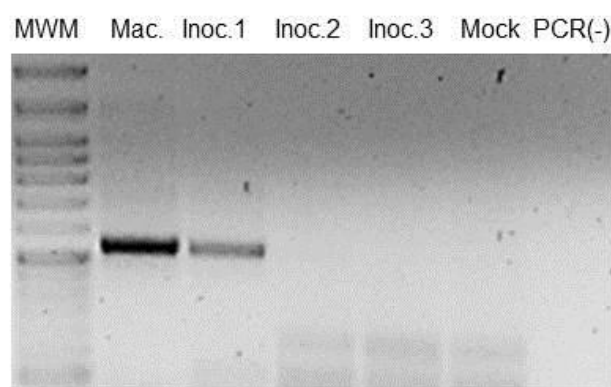


Figure 2A, Pereira et al., 2016



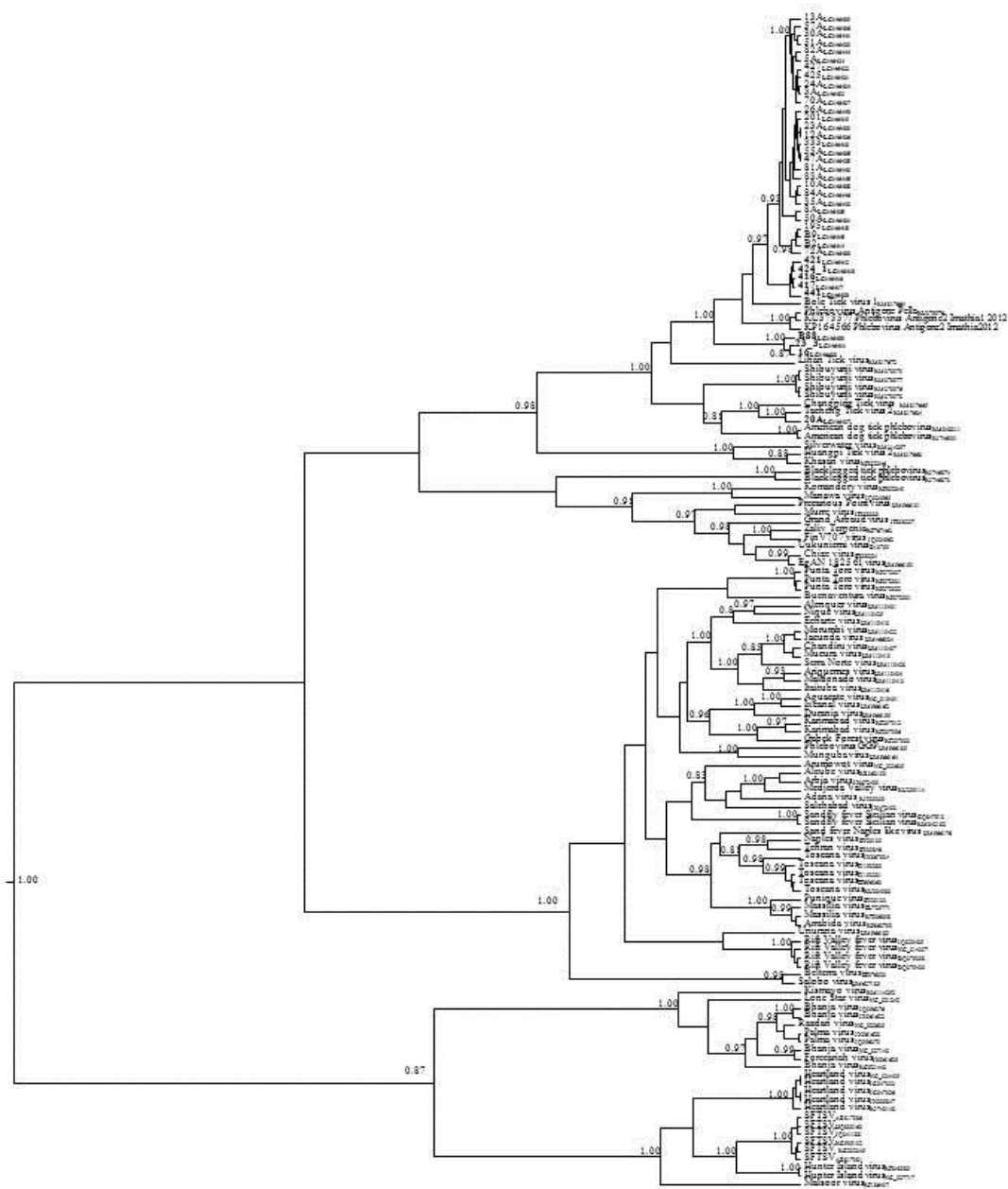
Phylogenetic tree of Bunyaviruses showing relationships between various viral lineages. The tree is rooted on the left and branches out to the right. Major clades are labeled: "AnLuc viral lineage" (top right), "KariMa viral lineage" (middle right), and "Goulaske virus" (bottom). Bootstrap values are indicated at the nodes. The tree shows a high degree of genetic differentiation between the AnLuc and KariMa lineages, and a closer relationship between the KariMa lineage and the Goulaske virus. The AnLuc lineage includes sequences from 13A to 70A, while the KariMa lineage includes sequences from 13A to 70A. The Goulaske virus is represented by a single sequence, 13A. The tree also shows relationships between various tick-borne viruses, including Bole Tick virus, Philobovirus, and others.

Figure 3, Pereira et al., 2016



[illegible]

Supplement. Figure 1B, Pereira et al., 2016



Supplement. Figure 2, Pereira et al., 2016

B88_LC146409	GKRRACQAKDINARFETVGTSSDLKTFWQTQHTTKLALTLKPTKKEHPPFIVRACSLFMKKRIKLDDDLQITIIINHHDLVTEDETALTLGAYRGLI	
16_LC146423		
23_3_LC146433		V
424_1_LC146410	HTQ	I
B2_LC146414	HTQ	I
24A_LC146434	HTQ	I
70A_LC146437	HTQ	I
13A_LC146439	HTQ	I
26A_LC146440	HTQ	I
417_LC146417	HTQ	I
12A_LC146426	HTQ	I
50A_LC146431	HTQ	I
441_LC146420	HTQ	I
81A_LC146443	HTQ	I
47A_LC146428	HTQ	I
51A_LC146429	HTQ	I
30A_LC146441	HTQ	I
3A_LC146432	HTQ	I
23A_LC146433	HTQ	I
83A_LC146445	HTQ	I
84A_LC146446	HTQ	I
10A_LC146438	HTQ	I
8A_LC146425	HTQ	I
5A_LC146424	HTQ	I
57A_LC146436	HTQ	I
425_LC146421	HTQ	I
72A_LC146430	HTQ	I
82A_LC146444	HTQ	I
55A_LC146435	HTQ	I
35A_LC146442	HTQ	I
B9_LC146415	HTQ	I
333_LC146413	H...HTQ	I
416_LC146416	HTQ	I
201_LC146419	HTQ	I
195_LC146418	HTQ	I
427_LC146422	HTQ	I
421_LC146412	R...HTQ	I
Phlebotomus_Antigona2_KU375576	T	I
Phlebotomus_Antigona2_KU375576	T	I
Phlebotomus_Antigona2_KU375577	Q...T	I
Bola_Tick_Virus_1_KM817664	R...K...TR...NFSQKI	I
20A_LC146427	DSRRNKD...HLK	PEV
Tacheng_Tick_Virus_2_KM817684	DSRRNKD...HLK	PEV
Changping_Tick_Virus_KM817683	S...SPSRGRLHLK	PEV
Shibuyunji_Virus_KM370979	R...CL...KS...TVDI	QP
Shibuyunji_Virus_KM370978	R...CL...KS...TVDI	QP
Shibuyunji_Virus_KM370977	R...CL...KS...TVDI	QP
Shibuyunji_Virus_KM370976	R...CL...KS...TVDI	QP
Lihan_Tick_Virus_KM817672	A...-AIR...SSQKI	RP
Huangpi_Tick_Virus_2_KM817668	RF...-MKICGNQHQ	RP

Table 1. General information briefly describing the tick samples from which phlebovirus L-sequences were obtained.

Tick species	Ticks analysed	Geographic origin (district)	Ticks collected from	Accession number (strain)
<i>Dermacentor marginatus</i>	n=9	Setúbal	Vegetation	LC146427 (20A)
<i>Hyalomma marginatum</i>	n=1	Beja	<i>Bos taurus</i>	LC146411 (23.3)
<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	n=47	Setúbal	Vegetation	LC146425 (8A), LC146426 (12A), LC146433 (23A), LC146434 (24A), LC146438 (10A), LC146439 (13A)
<i>R. sanguineus</i>	n=2	Setúbal	<i>Canis lupus familiaris</i>	LC146410 (424.1), LC146421 (425)
<i>R. sanguineus</i>	n=62	Lisboa	Vegetation	LC146430 (72A), LC146436 (57A), LC146437 (70A), LC146445 (83A), LC146446 (84A)
<i>R. sanguineus</i>	n=4	Lisboa	<i>Canis lupus familiaris</i>	LC146412 (421), LC146416 (416), LC146417 (417), LC146422 (427),
<i>R. sanguineus</i>	n=1	Beja	<i>Bos taurus</i>	LC146409 (B88)
<i>R. sanguineus</i>	n=8	Beja	<i>Ovis aries</i>	LC146414 (B2), LC146415 (B9)
<i>R. sanguineus</i>	n=1	Beja	<i>Buteo buteo</i>	LC146419 (201)
<i>R. sanguineus</i>	n=1	Faro	<i>Bubo bubo</i>	LC146418 (195)
<i>R. sanguineus</i>	n=1	Faro	<i>Eurinaceus europaeus</i>	LC146420 (441)
<i>Rhipicephalus bursa</i>	n=47	Setúbal	Vegetation	LC146428 (47A), LC146429 (51A), LC146431 (50A), LC146435 (55A), LC146441 (30A)
<i>R. bursa</i>	n=70	Lisboa	Vegetation	LC146424 (5A), LC146432 (3A), LC146440 (26A), LC146442 (35A), LC146443 (81A), LC146444 (82A)
<i>R. bursa</i>	n=1	Beja	<i>Ovis aries</i>	LC146413 (333)
<i>R. bursa</i>	n=4	Beja	<i>Bos taurus</i>	LC146423 (16)

Supplementary table 1. List of tick species, their gender, district of collection and origin (animal vs vegetation) analysed in the course of this work.

Pool	No. of ticks	Species	Stage/gender	Geographic origin (district)	Ticks collected from	Accession number (strain)
A1	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	LC146414*
A2	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A3	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A4	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A5	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A6	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A7	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A8	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A9	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	LC146415*
A10	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A11	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A12	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A13	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A14	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A15	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A16	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A17	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A18	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A19	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A20	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A21	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A22	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A23	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A24	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A25	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A26	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A27	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A28	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A29	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	

Anexos

A30	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A31	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	<i>Canis lupus familiaris</i>	LC146416
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	<i>Canis lupus familiaris</i>	LC146421
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Canis lupus familiaris</i>	
A32	3	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Canis lupus familiaris</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Lisboa	<i>Canis lupus familiaris</i>	LC146417
A33	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Lisboa	<i>Canis lupus familiaris</i>	
	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Setúbal	<i>Canis lupus familiaris</i>	LC146410
A34	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Bos Taurus</i>	
A35	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
A36	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
A37	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Faro	<i>Eurinaceus europaeus</i>	LC146420
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Buteo buteo</i>	LC146419
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Faro	<i>Bubo bubo</i>	LC146418
A38	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Faro	<i>Meles meles</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Faro	<i>Vulpes vulpes</i>	
A39	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A40	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A41	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Nymph	Beja	<i>Otis tarda</i>	
A42	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Nymph	Faro	<i>Athene noctua</i>	
A43	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Nymph	Faro	<i>Athene noctua</i>	
A44	3	<i>Hyalomma marginatum</i>	Nymph	Beja	<i>Athene noctua</i>	
	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Nymph	Faro	<i>Athene noctua</i>	
A45	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A46	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A47	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A48	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A49	2	<i>Hyalomma marginatum</i>	Nymph	Beja	<i>Otis tarda</i>	
	2	<i>Hyalomma</i>	Nymph	Faro	<i>Phoenicurus</i>	

A50	3	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Beja	<i>phoenicurus</i> <i>Tyto alba</i>	
	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Faro	<i>Bubo bubo</i>	
A51	3	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Beja	<i>Athene noctua</i>	
	3	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Faro	<i>Athene noctua</i>	
A52	5	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Faro	<i>Larus michahellis</i>	
	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Beja	<i>Accipiter gentilis</i>	
	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Faro	<i>Larus fuscus</i>	
A53	2	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	LC146411
	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A54	4	<i>marginatum</i> <i>Rhipicephalus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A55	4	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus</i>	Male	Beja	<i>Aquila fasciata</i>	
A56	3	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus</i>	Male	Faro	<i>Vulpes vulpes</i>	
	1	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus</i>	Male	Beja	<i>Vulpes vulpes</i>	
A57	2	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
	1	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus</i>	Female	Beja	<i>Aquila fasciata</i>	
	1	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus</i>	Female	Faro	<i>Vulpes vulpes</i>	
A58	4	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus</i>	
A59	4	<i>pusillus</i> <i>Ixodes</i> spp.	Female	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Oryctolagus</i>	
A60	4	<i>Ixodes ricinus</i>	Male	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Oryctolagus</i>	
A61	2	<i>Ixodes ricinus</i>	Male	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Lepus europaeus</i>	
	2	<i>Ixodes ricinus</i>	Male	Beja	<i>Oryctolagus</i>	
A62	4	<i>Ixodes frontalis</i>	Nymph	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Martes foina</i>	
A64	4	<i>Ixodes acuminatus</i>	Male	Beja	<i>Oryctolagus</i>	
A65	4	<i>Ixodes acuminatus</i>	Female	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Oryctolagus</i>	
A66	4	<i>Ixodes acuminatus</i>	Female	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Oryctolagus</i>	
A67	4	<i>Ixodes acuminatus</i>	Nymph	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Oryctolagus</i>	
A68	3	<i>Ixodes acuminatus</i>	Nymph	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Oryctolagus</i>	
	1	<i>Ixodes acuminatus</i>	Nymph	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Alectoris rufa</i>	
	1	<i>Ixodes acuminatus</i>	Nymph	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
	1	<i>Ixodes acuminatus</i>	Male	Beja	<i>Oryctolagus</i>	
A69	8	<i>Ixodes acuminatus</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Oryctolagus</i>	
A70	3	<i>lusitanicum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>cuniculus</i> <i>Ovis aries</i>	
	1	<i>lusitanicum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A72	3	<i>lusitanicum</i> <i>Ixodes frontalis</i>	Nymph	Beja	<i>Martes foina</i>	
	2	<i>Ixodes frontalis</i> <i>Hyalomma</i> spp.	Larva	Faro	<i>Athene noctua</i>	

A73	1	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Nymph	Faro	<i>Corvus corone</i>	
A74	1	<i>Hyalomma</i> spp.	Larva	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Hyalomma</i> spp.	Larva	Faro	<i>Athene noctua</i>	
	1	<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Male	Faro	<i>Larus michahellis</i>	
A75	3	<i>Haemaphysalis punctata</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Ixodes</i> spp.	Male	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A76	1	<i>Ixodes</i> spp.	Nymph	Beja	<i>Alectoris rufa</i>	
	1	<i>Ixodes</i> spp.	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Nymph	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
A77	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A78	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A79	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A80	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A81	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A82	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A83	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A84	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A85	5	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A86	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
A87	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A88	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	LC146409*
	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A89	5	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Nymph	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
A90	4	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A91	9	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A92	3	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A93	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A94	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A95	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A96	4	<i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	

A97	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A98	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A99	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A100	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A101	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A102	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A103	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A104	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A105	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A106	2	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
	2	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A107	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A108	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A109	4	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A110	2	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
	2	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A111	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Beja	<i>Athene noctua</i>	
	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>marginatum</i> <i>Hyalomma</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A112	4	<i>marginatum</i> <i>Rhipicephalus bursa</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	LC146423
A113	4	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A114	4	<i>bursa</i> <i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A115	3	<i>marginatus</i> <i>Dermacentor marginatus</i>	Male	Lisboa	<i>Sus scrofa</i>	
A117	5	<i>punctata</i> <i>Haemaphysalis punctata</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>punctata</i> <i>Haemaphysalis punctata</i>	Nymph	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
A118	5	<i>lusitanicum</i> <i>Hyalomma lusitanicum</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>lusitanicum</i> <i>Hyalomma lusitanicum</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A119	3	<i>ricinus</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	2	<i>ricinus</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Male	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>ricinus</i> <i>Ixodes ricinus</i>	Female	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A120	1	<i>sanguineus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	<i>Canis lupus familiaris</i>	LC146412
	1	<i>sanguineus</i> <i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	<i>Canis lupus familiaris</i>	

	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A121	2	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
	2	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A122	1	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
	1	<i>Hyalomma</i> spp.	Larva	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
	1	<i>Hyalomma</i> spp.	Larva	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A123	1	<i>Ixodes ricinus</i>	Female	Lisboa	<i>Sus scrofa</i>	
	1	<i>Ixodes ricinus</i>	Male	Lisboa	<i>Sus scrofa</i>	
	1	<i>Ixodes</i> spp.	Female	Lisboa	<i>Sus scrofa</i>	
	1	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	LC146413
A124	2	<i>Ixodes acuminatus</i>	Female	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	2	<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Ixodes ricinus</i>	Male	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A125	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A126	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A127	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A128	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A129	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A130	4	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A131	4	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A132	1	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Nymph	Beja	<i>Ovis tarda</i>	
	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A133	2	<i>Rhipicephalus pusillus</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Beja	<i>Ovis aries</i>	
A134	1	<i>Ixodes ricinus</i>	Female	Lisboa	<i>Sus scrofa</i>	
	1	<i>Ixodes ricinus</i>	Female	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Dermacentor marginatus</i>	Female	Lisboa	<i>Sus scrofa</i>	
A135	2	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Ixodes ricinus</i>	Female	Beja	<i>Lepus europaeus</i>	
	1	<i>Ixodes ricinus</i>	Female	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A136	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Beja	<i>Canis lupus familiaris</i>	
	1	<i>Rhipicephalus</i>	Female	Lisboa	<i>Bos taurus</i>	

A137	3	<i>sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A138	2	<i>Hyalomma lusitanicum</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A139	4	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Male	Beja	<i>Bos taurus</i>	
A140	3	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Ixodes</i> spp.	Female	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
A141	1	<i>Ixodes ricinus</i>	Nymph	Beja	<i>Oryctolagus cuniculus</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	<i>Canis lupus familiaris</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Canis lupus familiaris</i>	
A142	2	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Beja	<i>Ovis aries</i>	
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Lisboa	<i>Canis lupus familiaris</i>	LC146422
	1	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Male	Lisboa	<i>Ovis aries</i>	
V3	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Lisboa	Vegetation	LC146432*
V5	8	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Lisboa	Vegetation	LC146424*
V6	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V8	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146425*
V10	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146438*
V12	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146426*
V13	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146439*
V16	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V17	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V19	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V20	9	<i>Dermacentor marginatus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146427*
V22	3	<i>Dermacentor marginatus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V23	3	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146433*
V24	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146434*
V26	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Lisboa	Vegetation	LC146440*
V30	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Lisboa	Vegetation	LC146441*
V31	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V32	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V35	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Lisboa	Vegetation	LC146442*
V38	8	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Lisboa	Vegetation	

V39	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V40	1	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V41	6	<i>Hyalomma marginatum</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V45	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V46	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V47	10	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146428*
V49	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V50	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146431*
V51	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146429*
V52	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V54	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V55	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	LC146435*
V56	9	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Female	Setúbal	Vegetation	
V57	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	LC146436*
V59	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V62	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V63	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V68	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V70	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	LC146437*
V71	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V72	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	LC146430*
V74	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V75	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V78	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V79	10	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V80	4	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	Female	Lisboa	Vegetation	
V81	16	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Male	Lisboa	Vegetation	LC146443*
V82	16	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Male	Lisboa	Vegetation	LC146444*
V83	16	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Male	Lisboa	Vegetation	LC146445*
V84	16	<i>Rhipicephalus bursa</i>	Male	Lisboa	Vegetation	LC146446*

Supplementary table 2. Nucleotide reference sequences used in this work

Virus (strain)	Geographic origin	Host	Accession number
Adana (195)	Turkey	<i>Phlebotomus</i> sp.	KJ939330
Aguacate	Panama	<i>Lutzomyia</i> sp.	NC_015451
Alcube (S20)	Portugal	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	KR363190
Alenquer	Brazil	<i>Homo sapiens</i>	HM119401
American dog tick phlebovirus (ADTPV-1)	USA	<i>Dermacentor variabilis</i>	KJ746901
American dog tick phlebovirus (FI6)	USA	<i>Dermacentor variabilis</i>	KM048311
Arbia (ISS PHL18)	Italy	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	JX472400
Ariquemes	Brazil	<i>Lutzomyia</i> sp.	HM119404
Arrabida (PoSFPhlebV/126/2008)	Portugal	<i>Phlebotomus</i> sp	KP863799
Arumowot	Spain	NA*	NC_023635
Belterra (Be An 356637)	Brazil	<i>Proechimys longicaudatus</i>	EF076023
Bhanja (ibAr2709)	Nigeria	<i>Rhipicephalus decoloratus</i>	NC_027140
Bhanja (IG690)	India	<i>Haemaphysalis intermedia</i>	KC521440
Bhanja (M3811)	Portugal	NA*	JQ956376
Bhanja (R-1819)	USA	<i>Homo sapiens</i>	JX961622
Blacklegged tick phlebovirus-1 (RTS1)	USA	<i>Ixodes scapularis</i>	KJ746873
Blacklegged tick phlebovirus-2 (RTS2)	USA	<i>Ixodes scapularis</i>	KJ746874
Bole Tick Virus 1 (BL075)	China	<i>Hyalomma asiaticum</i>	KM817664
Buenaventura (CoAr3319)	Colombia	Sandfly**	KP272001
Chandiru	Brazil	<i>Homo sapiens</i>	HM119407
Changping Tick Virus 1 (CP1-2)	China	<i>Dermacentor</i> sp.	KM817665
Chize (Brest Ar/T2913)	France	<i>Ixodes frontalis</i>	JF838324
Durania (Co Ar 171162)	Colombia	<i>Lutzomyia</i> sp.	HM566155
Echarte	Peru	<i>Homo sapiens</i>	HM119410
EgAN 1825-61	NA*	NA*	HM566159
FinV707 (FinV707)	Norway	<i>Ixodes uriae</i>	JQ924562
Forecariah (DakArk4927)	Guinea	<i>Rhipicephalus geigy</i>	JX961625
Gabek Forest (Sud AN 754-6)	Sudan	<i>Acomys cahirinus</i>	KF297903
Gouleako (A5/CI/2004)	Ivory Coast	<i>Culex</i> sp.	HQ541738
Grand Arbaud (Argas 27)	France	<i>Argas reflexus</i>	JF838327
Heartland (Patient1)	USA	<i>Homo sapiens</i>	NC_024495
Heartland (Patient2)	USA	<i>Homo sapiens</i>	JX005847
Heartland (TN)	USA	<i>Homo sapiens</i>	KJ740148
Heartland virus	NA*	NA*	JC047333
Heartland virus	NA*	NA*	JC047326
Huangpi Tick Virus 2 (H114-17)	China	<i>Haemaphysalis</i> sp.	KM817668
Hunter Island	Australia	<i>Ixodes eudyptidis</i>	KF848980
Hunter Island (CSIRO1568)	Australia	<i>Ixodes eudyptidis</i>	NC_027717
Itaituba	Brazil	<i>Didelphis marsupialis</i>	HM119416
Ixcanal (CA Ar 170897)	Guatemala	<i>Lutzomyia</i> sp.	HM566162
Jacunda	Brazil	<i>Myoprocta acouchy</i>	HM466934
Karimabad (91019-P)	Iran	<i>Phlebotomus papatasi</i>	KF297906
Karimabad (I-58)	Iran	<i>Phlebotomus</i> sp.	KF297912

Khasan (LEIV-776P)	Russia	<i>Haemaphysalis longicornis</i>	KF892046
Kismayo (LEIV3641A)	Somalia	<i>Rhipicephalus pulchellus</i>	KM114252
Komandory (LEIV-13856)	Russia	<i>Ixodes uriae</i>	KF892049
Lihan (LH-1)	China	<i>Rhipicephalus microplus</i>	KM817672
Lone Star (TMA 1381)	USA	<i>Amblyomma americanum</i>	NC_021242
Maldonado (FMD 0077)	Peru	<i>Homo sapiens</i>	HM119413
Malsoor (NIV1050650)	India	<i>Rousettus leschenaultii</i>	KF186497
Manawa (PakT 462)	Pakistan	<i>Argas abdussalami</i>	JQ924565
Massilia (127)	Portugal	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	KT906098
Massilia (W)	France	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	EU725771
Medjerda Valley (T131)	Tunisia	<i>Phlebotomus</i> sp.	KU255114
Morumbi	Brazil	<i>Homo sapiens</i>	HM119422
Mucura	Brazil	<i>Anopheles triannulatus</i>	HM119419
Munguba	NA*	NA*	HM566164
Murre (Murre H)	USA	<i>Uria</i> sp.	JF838330
Naples (Yu 8/76)	Yugoslavia	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	JF920139
Nique	Panama	<i>Lutzomyia panamensis</i>	HM119425
Palma (M3443)	Portugal	NA*	JQ956379
Palma (PoTi4.92)	Portugal	<i>Haemaphysalis punctata</i>	JX961628
Phlebovirus (GGP-2011a)	Venezuela	Sentinel hamster**	HM566185
Phlebovirus (JS24)	China	<i>Homo sapiens</i>	HQ830163
Phlebovirus (WCH/97/HN/China/2011)	China	<i>Homo sapiens</i>	JQ341188
Phlebovirus Antigone (Antigone2-Imathia1-Greece-2012)	Greece	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	KU375577
Phlebovirus Antigone (Antigone2-Imathia-Greece-2012)	Greece	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	KP164566
Phlebovirus Antigone (Antigone2-Pella2-Greece-2013)	Greece	<i>Rhipicephalus sanguineus</i>	KU375576
Precarious point	NA*	NA*	HM566181
Punique (PI-B4-2008)	Tunisia	<i>Phlebotomus</i> sp.	JF920133
Punta Toro (Balliet)	Panama	<i>Homo sapiens</i>	KP272022
Punta Toro (GML488831)	Panama	<i>Homo sapiens</i>	KP272031
Punta Toro (PAN483391)	Panama	<i>Homo sapiens</i>	KP272007
Razdan (LEIV-Arm2741)	Armenia	<i>Dermacentor marginatus</i>	NC_022630
Rift Valley	Egypt	<i>Homo sapiens</i>	NC_014397
Rift Valley (OS-1)	Mauritania	<i>Homo sapiens</i>	DQ375398
Rift Valley (Smithburn)	Uganda	NA*	DQ375430
Rift Valley (Sudan 85-2010)	Sudan	<i>Homo sapiens</i>	JQ820485
Salehabad (I-81)	Iran	<i>Phlebotomus</i> sp.	JX472403
Salobo	NA*	NA*	HM627185
Sand fever Naples-like (Poona)	NA*	NA*	HM566176
Sandfly fever Sicilian (Ethiopia-2011)	Ethiopia	<i>Homo sapiens</i>	KM042102
Sandfly Sicilian Turkey (Izmir 19)	Turkey	<i>Homo sapiens</i>	GQ847513
Serra Norte	Brazil	<i>Homo sapiens</i>	HM119428
SFTS (HNXY_319)	China	<i>Homo sapiens</i>	KC292345
SFTS (JS2011-034)	China	<i>Homo sapiens</i>	KC505132
SFTS (SPL004A)	Japan	<i>Homo sapiens</i>	AB817981
SFTS (SPL035A)	China	<i>Homo sapiens</i>	AB817986
Shibuyunji (CZCZT13-14)	Zambia	<i>Boophilus</i> sp.	KM370976

Anexos

Shibuyunji (CZCZT13-18)	Zambia	<i>Boophilus</i> sp.	KM370977
Shibuyunji (CZCZT13-22)	Zambia	<i>Boophilus</i> sp.	KM370978
Shibuyunji (CZCZT13-23)	Zambia	<i>Boophilus</i> sp.	KM370979
Silverwater (Can131)	Canada	<i>Haemaphysalis</i> <i>leporispalustris</i>	KM114257
Tacheng Tick Virus 2 (TC252)	China	<i>Dermacentor marginatus</i>	KM817684
Tehran (I-47)	Iran	<i>Phlebotomus perfiliewi</i>	JF939846
Toscana (AR)	France	<i>Phlebotomus perniciosus</i>	EF656363
Toscana (EsPhGR40)	Spain	<i>Phlebotomus</i> sp.	FJ153280
Toscana (H/IMTSSA)	France	<i>Homo sapiens</i>	FJ153281
Toscana (T152)	Tunisia	<i>Phlebotomus</i> sp.	JX867534
Toscana (TOSV/P51)	France	<i>Phlebotomus</i> sp.	KU204980
Uriurana	NA*	NA*	HM566189
Uukuniemi	NA*	NA*	D10759
Zaliv Terpenia (LEIV-13841Ka)	Russia	<i>Ixodes uriae</i>	KF767463

* NA (not available), ** Undefined species